Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie Tübingen
Direktor: Professor Dr. U. Henning
und der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Phasenumwandlungen von Lipopolysaccharid (Endotoxin) in vitro und in der Zellwand Gram-negativer Bakterien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

GEORG EMMERLING
aus Gunzenhausen

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0073

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie Tübingen
Direktor: Professor Dr. U. Henning
und der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Phasenumwandlungen von Lipopolysaccharid (Endotoxin) in vitro und in der Zellwand Gram-negativer Bakterien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GEORG EMMERLING
aus Gunzenhausen
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. N. Schwenzer

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Henning

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Herrn Professor Dr. U. Henning danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für sein ständig gezeigtes Interesse und viele wertvolle Anregungen, sowie für die Durchführung der Aminosäure-Analysen. Herrn Professor Dr. P. Overath und Herrn Dr. L. Thilo danke ich für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen.

Herrn Professor Dr. M. Eggstein danke ich für die Beurteilung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin der Max-Planck-Gesellschaft für die Gewährung eines Stipendiums.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN 8

I. Material 8

II. Methoden 9

1. Präparative Methoden 9

a) Isolierung von LPS aus E. coli B/r 9
b) Elektrodialyse von LPS 10
c) Mischung von LPS und Phospholipid 11
d) Bakterienstämme 12
e) Medien und Wachstumsbedingungen 12
f) Hüllenpräparation 13
g) Weiterbehandlung der Hüllen 13
h) Membranfraktionen 14
i) Einbau von Phospholipid bzw. LPS in Hüllen 15

2. Analytische Methoden 16

a) Bestimmung von KDO 16
b) Aminosäure-Analyse 17
c) pH-Titration 17

3. Methoden zur Bestimmung der Phasenumwandlung 18

a) Fluorimetrie 18
b) Lichtstreuung 19
c) Auswertung der Umwandlungskurven 19

C. ERGEBNISSE 22

I. Phasenumwandlung von isoliertem LPS 22

1. Messung der Phasenumwandlung mit Fluorimetrie 22

a) Elektrodialyse von LPS 22

α) Phasenumwandlung von LPS nach Elektrodialyse 23

ß) Analyse von LPS vor und nach Elektrodialyse 24

b) pH-Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur 25

α) pH-Titration von LPS 25

ß) Phasenumwandlung in Abhängigkeit vom pH 26

c) Phasenumwandlung in Gegenwart von Kationen 27

α) Einwertige Kationen 27

ß) Zweiwertige Kationen 29

2. Messung der Phasenumwandlung mit Lichtstreuung 31

a) Phasenumwandlung von LPS 31

b) Vergleich von Lichtstreuung und Fluorimetrie 32

c) Phasenumwandlung in Abhängigkeit der Beschallzeit 33

II. Phasenumwandlung von Hüllenpräparationen und Membranfraktionen 34

1. Phasenumwandlung der Membranfraktionen 35

a) E. coli B/r 36

b) E. coli P 400 und P 692-2d 37

2. Phasenumwandlung von Hüllen 41

a) Hüllen von E. coli B/r 42
b) Hüllen von E. coli P 692-2d 44
c) Vergleich der Membranfraktionen mit den Hüllenpräparationen 45
d) Elaidinsäure-Hüllen von E. coli K 1062 46
e) Ölsäure-Hüllen von E. coli K 1062 48

3. Elektrodialyse von Hüllen 51

III. Mischung von LPS und Phospholipid 53

1. Mischung nach der Methode von Rothfield 53
2. Mischung in Phenol/Chloroform/Petroleumbenzin 55
3. Mischung durch Ultraschall-Behandlung 56

IV. Zugabe von Phospholipid und LPS zu Hüllen 58

1. Zugabe von Phospholipid zu Hüllen 59

a) Hüllen des Wildtyps E. coli K 2464 59
b) Hüllen der Mutante E. coli K 2754 62

2. Zugabe von LPS zu Hüllen 63

D. DISKUSSION 65

1. Isoliertes LPS 65
2. LPS in der äußeren Membran 70

E. ZUSAMMENFASSUNG 77

F. ABKÜRZUNGEN 80

G. LITERATURVERZEICHNIS 81

A. EINLEITUNG

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist eine der Hauptkomponenten der Zellwand Gram-negativer Bakterien (1-3). Der LPS-Anteil von Escherichia coli beträgt 9-12 % der Gesamtmasse der Zellwand (4). Aus Untersuchungen an Salmonella typhimurium ist bekannt, daß das LPS asymmetrisch verteilt ist und nur an der Außenfläche der äußeren Membran vorkommt (5,6). 15-25 % der Bakterienoberfläche werden vom LPS bedeckt, was nicht ausreicht eine geschlossene Lipidschicht zu bilden (5). Diese Fakten sind schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben:

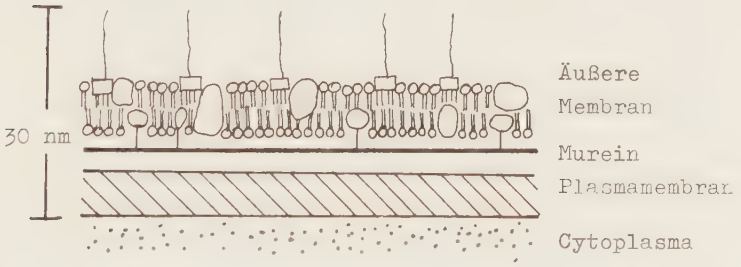
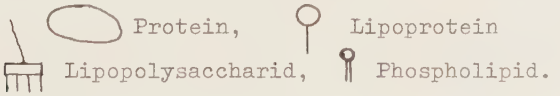


Abb. 1 Schematischer Aufbau der Zellwand Gram-negativer Bakterien (7,8).

Die Symbole haben folgende Bedeutung:



Ob, wie hier angegeben, Phospholipid an beiden Flächen der äußeren Membran vorkommt, ist ungeklärt.

Das LPS ist ein Träger der antigenen Determinanten (O-Antigen oder Körper-Antigen) der Gramnegativen Bakterien (9) und zeigt eine toxische Wirkung, weshalb es auch als Endotoxin bezeichnet wird. Milde saure Hydrolyse spaltet das LPS-Molekül mit einem Molekulargewicht des Monomeren von ca. 10 000 in einen Lipidanteil, das sogenannte Lipid A und einen komplexen Polysaccharidanteil (s. Abb. 2). Das Polysaccharid kann weiter unterteilt werden in ein Kern-Polysaccharid ("core"), das bei allen bisher untersuchten Bakterien ziemlich ähnlich gebaut ist und das O-spezifische Polysaccharid (O-Antigen), das aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten gebildet wird und variabel bezüglich Zusammensetzung und Anzahl der Oligosaccharideinheiten ist. Durch diese Variationsmöglichkeit des O-Antigens ergibt sich die außerordentliche Vielzahl der bekannten Enterobakterien, die serologisch unterschieden und in Schemata eingeordnet werden können (10). Die serologische Spezifität des LPS ermöglicht neben der Diagnostik eine prophylaktische Impfung (z.B. BCG-Impfung) und die Serum-Behandlung von Krankheiten, die von Gram-negativen Erregern hervorgerufen werden.

Die Toxizität des LPS wird durch das Lipid A (11) bedingt. Dieses setzt sich zusammen aus einem Diglucosamin, an das Fettsäuren als Ester oder Amide gebunden sind (vgl. Abb. 2). Abhängig von der injizierten Menge LPS und vorangehender Sensibilisierung können die verschiedensten Symptome beginnend von leichtem Fieber bis zum irreversiblen Schock ausgelöst werden.

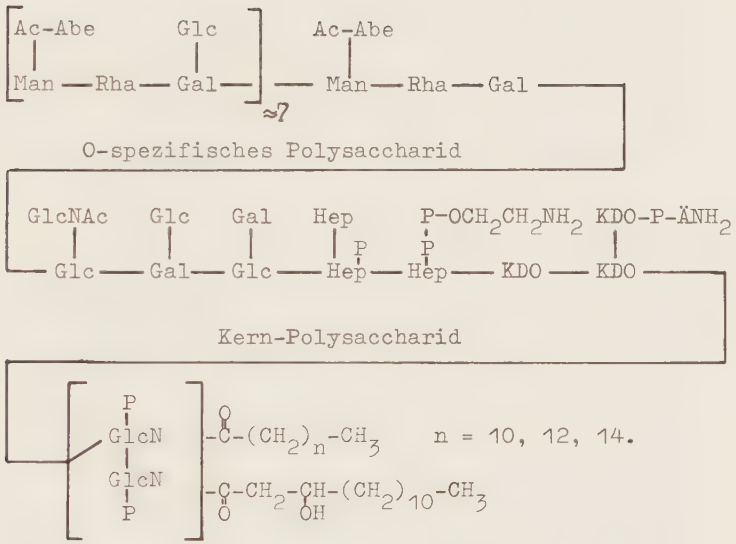


Abb. 2 Strukturformel des LPS von Salmonella typhimurium nach (12).

Abkürzungen:
Abe = Abequose, Ac = Acetyl, $ÄNH_2$ = Äthanolamin, Gal = D-Galaktose, Glc = D-Glucose, GlcN = D-Glucosamin, Hep = L-Glycero-D-mannoheptose, KDO = 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, Man = Mannose, P = Phosphat, Rha = L-Rhamnose.

Das LPS hat in letzter Zeit sehr an Bedeutung gewonnen, insbesondere wegen der Probleme mit der Antibiotika-Resistenz von Bakterien, die durch Plasmide vermittelt wird (11). Eine fast unübersehbare Literatur befaßt sich außerdem mit der Rolle des LPS als mitogenem Agens, also mit dem Studium des detaillierten Mechanismus der Immunantwort (13,14).

Physikalisch-chemische Eigenschaften des LPS

Während die chemische Strukturaufklärung des LPS als fast abgeschlossen gelten kann, ist noch sehr wenig über dessen physikalisch-chemische Eigenschaften, sowohl im isolierten Zustand als auch in der Zellwand, bekannt. Dieses Verhalten ist sowohl von wissenschaftlichem, als auch von praktisch-medizinischem Interesse.

Isoliertes LPS bildet geordnete Doppelschichten, die denen der Lipide sehr ähnlich sind (15). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von LPS in Wasser zeigen eine bandartige Struktur der Doppelschichten. Shands schlug für diese Struktur das in Abbildung 3 wiedergegebene Modell vor:

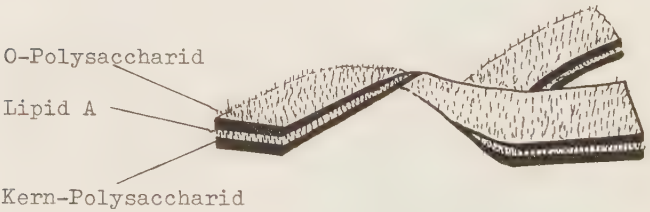


Abb. 3 Modell der LPS-Doppelschicht (16).

In Abbildung 3 stellt die dicke schwarze Linie das Kern-Polysaccharid dar. Das Lipid A zeigt nach innen, während die O-Polysaccharidketten nach außen zeigen. Für dieses Modell ergeben sich nach Shands in guter Übereinstimmung mit anderen Autoren folgende Dimensionen: Das Zentrum, bestehend aus dem Lipidanteil, ist etwa 40 Å dick, während das Kern-Polysaccharid auf jeder Seite 15 Å mißt.

Seit längerem ist bekannt, daß Lipid-Doppelschichten Phasenumwandlungen zeigen, wobei die Lipidmoleküle in Abhängigkeit von der Temperatur von einem "kristallinen", geordneten in einen "flüssigen", ungeordneten Zustand übergehen (17-20).

Auch isoliertes LPS zeigt eine temperaturabhängige Phasenumwandlung, die mittels Fluorimetrie und Röntgenstrahlbeugung gemessen werden kann (21).

In Abbildung 4 ist die Phasenumwandlung von LPS aus E. coli B/r in wässriger Suspension dargestellt. Als Fluoreszenzindikator wurde N-Phenyl-1-naphthylamin (NPN) verwendet.
Diejenige Temperatur, bei welcher 50% der Fettsäureketten des LPS im geordneten Zustand vorliegen, wird als Umwandlungstemperatur bezeichnet. In der Abbildung beträgt sie mit ansteigender Temperatur gemessen 22 °C. Die Breite der Phasenumwandlung ΔT ist 9 °C. Die Weitwinkel-Röntgenstrahlbeugung ergibt für die Umwandlungstemperatur T_t einen Wert von 21°C und ΔT ist etwa 10 °C. Zusätzlich zeigt die Weitwinkelmessung, daß die Fettsäureketten beim LPS im ungeordneten Zustand einen Abstand von 4.5 Å zueinander haben, der durch Temperaturerniedrigung in den geordneten Zustand mit einem Abstand von 4.33 Å

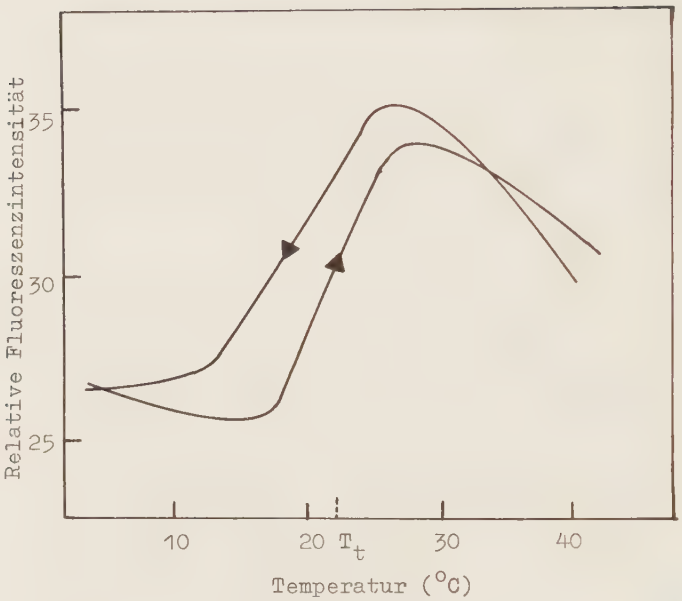


Abb. 4 Phasenumwandlungskurve von LPS bei zu- und abnehmender Temperatur. Die Pfeilspitzen geben den Temperaturverlauf während der Messung an.
LPS-Suspension in Wasser: 40 µM
NPN-Konzentration: 6.6 µM.

übergeht (21). Die entsprechenden Werte bei Lipiden sind 4.2 Å für den geordneten und ebenfalls 4.5 Å für den ungeordneten Zustand (22,23).

Ausgehend von der Tatsache, daß isoliertes LPS eine definierte Phasenumwandlung zeigt, werden in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkungen von LPS mit verschiedenen Komponenten hinsichtlich des Einflusses auf die Phasenumwandlung untersucht.

Welchen Einfluß haben beispielsweise Kationen wie Natrium und Magnesium, die ja in jeder Bakterienzelle vorkommen, oder die Wasserstoffionenkonzentration auf die Phasenumwandlung des LPS?

Um mehr über mögliche Wechselwirkungen von LPS und Phospholipiden in der äußeren Membran Gramnegativer Bakterien zu erfahren, wurden systematische Untersuchungen von in vitro hergestellten Mischungen von LPS und Phospholipid bezüglich der Phasenumwandlung durchgeführt. Weiter wurden die Phasenumwandlungen verschiedener Präparationen von Zellhüllen und der äußeren Membran von Bakterien mittels Fluorimetrie gemessen. Welchen Einfluß hat das LPS auf deren Phasenumwandlung und welche Veränderungen würden sich für die verschiedenen Präparationen ergeben? Würden sich aufgrund dieser Messungen vielleicht sogar Hinweise auf die Anordnung von LPS in der Bakterienmembran ableiten lassen?

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Antibiotic Medium No. 3 Casamino Acids	Difco-Laboratories, Detroit (USA)
Brij 35, Elaidinsäure Ölsäure	Carl Roth oHG, Karlsruhe
Dimyristoylphosphatidyl- äthanolamin	Serva-Entwicklungs- labor, Heidelberg
Dipalmitoyl-1-α-Lecithin	
Lysozym	Boehringer, Mannheim
N-Phenyl-1-naphthylamin	Eastman-Kodak, Rochester (USA)

Alle anderen, hier nicht erwähnten Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Bakterien

Escherichia coli B/r aerob bei 37 °C gezüchtet. Medium s. (24).	E. Merck, Darmstadt

Sonstige Materialien

Glasperlen (Ø 0.17 mm)	Braun, Melsungen
Ultrafilter SM 117 39	Sartorius, Göttingen

Zum Waschen der Bakterien wurde deionisiertes, zu allen übrigen Prozeduren quarzdestilliertes Wasser verwendet.

II. Methoden

1. Präparative Methoden

a) Isolierung von LPS aus E. coli B/r

Die Isolierung von LPS erfolgte nach einer Vorschrift von Galanos et al. (25) aus gekauften Zellen. Die tiefgefrorenen Bakterien (200 g) wurden mit Wasser gewaschen und anschließend nacheinander einmal mit Äthanol, Aceton und zweimal mit Äther (jeweils 600 ml) extrahiert. Anschließend wurden die Zellen im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Auf diese Weise wurden 40 g getrocknete Zellen erhalten.

Diese wurden dreimal mit je 300 ml Extraktionsgemisch bestehend aus Phenol-Wasser (90:4 w/v), Chloroform und Petroleumbenzin mit einem Siedebereich von 40-60 °C im Verhältnis 2:5:8 (v/v/v) extrahiert. Die getrockneten Zellen wurden dem Gemisch langsam unter Rühren zugegeben und die Mischung jeweils noch 30 Minuten weitergerührt. Die Bakterienreste wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 15 Min.) und der Überstand, der das LPS enthielt, durch ein Papierfilter in einen 2-Liter-Kolben filtriert. Chloroform und Petroleumbenzin wurden vollständig am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30-40 °C entfernt. Es wurde eine etwas trübe, bräunliche Phenollösung (ca. 120 Milliliter) erhalten. Diese wurde in ein Becherglas gegossen und unter Rühren solange langsam Wasser zugetropft bis das LPS ausfiel. Die Zugabe von Wasser (etwa 10-15 ml) wurde beendet, sobald

sich das LPS nach ein bis zwei Minuten spontan abzusetzen begann. Zuviel Wasser führt zu einer Phasentrennung, was unbedingt zu vermeiden ist. Das ausgefallene LPS wurde abzentrifugiert (3000 Upm, 5 Min.), der Überstand dekantiert und die Innenseite des Zentrifugeneinsatzes mit Papier ausgewischt. Der Niederschlag wurde zweimal mit wenig achtzigprozentigem Phenol (ca. 5 ml) gewaschen, der Überstand verworfen und der Bodensatz anschließend viermal mit Äther extrahiert um das restliche Phenol zu entfernen. Der Rückstand wurde im Exsikkator getrocknet, in 150 ml Wasser suspendiert und lyophilisiert. Es wurden etwa 500 mg LPS erhalten.

b) Elektrodialyse von LPS

Die Elektrodialyse wurde entsprechend einer Vorschrift von Galanos und Lüderitz (26) durchgeführt. Dazu wurde der Elektrodialysator SM 165 30 (Filterdurchmesser 5 cm, Fassungsvermögen 10 ml) der Firma Sartorius verwendet. Er besteht aus drei Kammern (Anoden-, Dialyse- und Kathodenkammer), die durch zwei Filtermembranen voneinander getrennt werden. Als Dialysemembran wurden die Ultrafilter SM 117 39 der Firma Sartorius-Membranfilter, Göttingen, mit einer Porengröße von weniger als 5 nm verwendet.

Eine Suspension von 70 mg LPS in 10 ml Wasser wurde in die Dialysekammer gefüllt und bei 4 °C mit einer Stromstärke von 10 Milliampère und einer Spannung von 100 V insgesamt 4 Stunden dialysiert. Während dieser Zeit wurde das Wasser in der Anoden- und Kathodenkammer dreimal erneuert.

c) Mischung von LPS und Phospholipid

α) Mischung nach der Methode von Rothfield (27)

0.5 und 3 µMol Phosphatidyläthanolamin wurden in 0.2 ml Methanol gelöst und die Suspension von 0.1 µMol LPS in 0.3 ml Wasser, das 1.5 µMol EDTA enthielt, zugegeben. Anschließend wurde die Mischung eine halbe Stunde im Wasserbad auf 60 °C erhitzt und über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Dann wurde mit Wasser auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und die Phasenumwandlung gemessen.

β) Mischung in Phenol/Chloroform/Petroleumbenzin

1 µMol Phospholipid (Lipidextrakt aus Bakterienzellen) wurde in 5 ml Chloroform gelöst und danach 2 ml Phenol und 8 ml Petroleumbenzin zugegeben. Dazu wurden 0.5 µMol LPS gegeben. Sowohl das LPS, als auch das Phospholipid lösten sich in diesem Gemisch. Chloroform und Petroleumbenzin wurden abrotiert und das Phenol mit Äther extrahiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die Phasenumwandlung gemessen.

γ) Mischung durch Ultraschall-Behandlung

Verschiedene molare Mischungsverhältnisse von LPS und Phospholipid (5:1, 1:1, 1:5) wurden in Wasser mit Ultraschall behandelt und anschließend die Phasenumwandlung gemessen. Das Phospholipid wurde vorher bereits etwa zehn Minuten beschallt um für die Mischung kleinere Vesikel anzubieten.

d) Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle Stämme mit Ausnahme von E. coli B/r sind Abkömmlinge von E. coli K 12. Der Wildtyp K 2464 und die LPS-Mutante K 2754 wurden freundlicherweise von Dr. K. Jann zur Verfügung gestellt.

Tab. 1 Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
B/r	Wildtyp	
K 12-P 400	Wildtyp bezüglich der Proteine der äußeren Membran	(28)
P 692-2d	Mutante von P 400 Proteine I und II* fehlen	(29)
K 12 Y mel	Wildtyp	(30)
K 1062	Mutante von K 12 Y mel Auxotrophie für Fettsäuren	(30)
K 12-K 2464	Wildtyp	Jann
K 2754	LPS-Mutante (keine Heptose) von K 2464	Jann

e) Medien und Wachstumsbedingungen

Die Stämme E. coli K 12 Y mel, P 400, K 2464, sowie die Mutanten P 692-2d und K 2754 wuchsen bei 30 °C in Antibiotic Medium (17.5 g/l) unter starker Belüftung. Die Zellen wurden in der späten lo-

garithmischen Phase des Wachstums bei einer Zellzahl von etwa $5x10^8$/ml geerntet.

E. coli K 1062 wuchs in Cohen-Rickenberg Mineralsalzmedium, dem 0.5% Glycerin, 0.3% Casaminoacids, 0.2% Brij 35 und 0.01% Elaidin- bzw. Ölsäure zugesetzt waren (31). Die Zellen, die mit Elaidinsäure substituiert wurden, wuchsen bei 40 °C, diejenigen, deren Medium Ölsäure enthielt, bei 20 °C.

f) Hüllenpräparation (32)

Die Zellen wuchsen unter den oben angegebenen Bedingungen bis zu einer Zellzahl von $5x10^8$/ml heran. 10 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 60 ml Wasser suspendiert und 50 g Glasperlen (Durchmesser 0.17-0.18 mm) zugegeben. Diese Suspension wurde anschließend insgesamt drei Minuten unter Kühlung mit Kohlendioxidschnee in einem Gerät der Firma Braun, Melsungen, mit hoher Frequenz geschüttelt und nach Kontrolle unter dem Mikroskop die so entstandenen Hüllen auf einer Glasfritte abgesaugt, wobei das Filtrat mit Wasser auf 200 ml verdünnt wurde. Dieses wurde dann drei Minuten bei 4500xg mit der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert um die ganzen Zellen abzutrennen und der Überstand wurde zehn Minuten bei 4500 x g zentrifugiert um Zellbruchstücke zu entfernen. Im Sediment waren die Hüllen. Diese wurden noch mit Wasser gewaschen und anschließend in Puffer aufgenommen.

g) Weiterbehandlung der Hüllen

Die Hüllen wurden in Anlehnung an eine Vor-

schrift von Osborn (33), durch die die äußere Membran und die Cytoplasmamembran von Bakterien getrennt werden können, weiterbehandelt.

Etwa 1 g feuchte Hüllen wurden in 10 ml einer Mischung von 10 mM Trispuffer pH 7.8 und 0.75 M Sucrose bei Raumtemperatur suspendiert. Dazu wurden 2 mg Lysozym gegeben, zwei Minuten gerührt und danach 20 ml einer 1.5 mM EDTA-Lösung mit einem pH von 7.5 tropfenweise zugegeben. Es wurde 30-60 Min. gerührt und danach 15 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in Wasser aufgenommen. Danach wurde die optische Dichte bei 436 nm bestimmt.

Die verschiedenen Ansätze wurden bis zur jeweils angegebenen Präparationsstufe bearbeitet und anschließend wurde die Phasenumwandlung mit NPN fluorimetrisch gemessen.

h) Membranfraktionen (33)

Die Bakterien wurden mit kalter 0.9%iger Natriumchloridlösung gewaschen, bei 4 °C zentrifugiert (10 000 Upm, 10 Min.) und anschließend 3 g (Feuchtgewicht) in 30 ml 0.5 M Sucroselösung und 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) bei 4 °C suspendiert. Hierzu wurden unter Rühren 0.6 mg Lysozym gegeben, zwei Minuten inkubiert, anschließend 60 ml 1.5 M EDTA (pH 7.5) langsam unter Rühren zugegeben und etwa 30 Min. im Eisbad weitergerührt bis sich Sphäroplasten gebildet hatten. Dies wurde mit dem Mikroskop kontrolliert. Die Suspension wurde jetzt solange mit Ultraschall bei 0-5 °C behandelt, bis die Lösung fast durchsichtig geworden war. Dabei

wurde die Zellwand beschädigt und das Cytoplasma lief aus. Noch intakte Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (1 500 x g, 20 Min.) und der Überstand in einer Spinco-Zentrifuge (38 000 Upm, 3 Std.) zentrifugiert. Das Sediment wurde in maximal 6 ml 25%iger Sucroselösung, die 5 mM EDTA enthielt, aufgenommen, gut suspendiert und auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen, der ausgehend von einem Sucrose-Gehalt von 30% in Schritten von 5% bis zu einem Sucrose-Gehalt von 55% anstieg. Anschließend wurde der Gradient in einem Schwenkrotor (SW 1-Ti) 19 Std. bei 36 000 Upm zentrifugiert und die drei Banden, die sich in diesem Dichtegradienten eingestellt hatten, mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Während der Gleichgewichtszentrifugation wurde die äußere Membran (H-Bande) mit der größeren Dichte von der Cytoplasmamembran (L-Bande) mit der geringeren getrennt. Zwischen diesen beiden Banden war noch eine weitere (M-Bande), die ein Gemisch aus äußerer Membran und Cytoplasmamembran enthielt. Die Membranfraktionen wurden mit einer Lösung von 20 mM Tris und 0.2% Magnesiumsulfat in Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt und 3 Std. bei 38 000 Upm zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in Wasser suspendiert und nochmals zentrifugiert.

i) Einbau von Phospholipid bzw. LPS in Hüllen

Zu diesem Zweck wurde eine Vorschrift von Devor et al. (34) modifiziert.

Zu 500 µg Hüllen (0.5 ml einer Suspension mit einer optischen Dichte bei 436 nm von 0.8) in

20 mM Kaliummaleat (pH 6.6) wurden 500 µg Dimyristoylphosphatidyäthanolamin (DMPE) und zu einzelnen Ansätzen zusätzlich noch 20 mM Magnesiumchlorid gegeben. Anschließend wurde eine Stunde bei 45 °C inkubiert und 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert, einmal mit Puffer und zweimal mit Wasser gewaschen und jeweils 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde das Zentrifugat in 3 ml 30 mM Kaliummaleatpuffer aufgenommen und für die fluorimetrische Messung NPN zugegeben.

Für das LPS gilt die beschriebene Prozedur analog. Zu 500 µg Hüllen wurde 1 mg LPS gegeben, das jedoch vorher mit Ultraschall behandelt worden war, um kleinere Vesikel anzubieten. Außerdem wurden die Proben bei 3 000 x g jeweils 10 Min. zentrifugiert um nicht eingebautes LPS abzutrennen.

2. Analytische Methoden

a) Bestimmung von 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (35,36)

Ungefähr 1 mg LPS wurde in 1 ml 0.25 N Schwefelsäure 8 Min. auf 100 °C erhitzt, abgekühlt und 5 Min. mit einer Sorvall-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und davon eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden 50 µl 0.1 N Perjodsäure in Wasser gegeben. Nach 10 Min. Erhitzen auf 55 °C und Abkühlen wurden 0.2 ml 4%ige Natriumarsenitlösung in 0.5 N Salzsäure zugegeben, geschüttelt und 2 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurden 0.8 ml 0.6%ige Thiobarbitursäure zugegeben und 10 Min. auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen

wurde mit 2 ml Cyclohexanon unter Schütteln der rote Farbstoff extrahiert. Durch Zentrifugation trennten sich die Phasen und das Cyclohexanon ließ sich abheben. Die Extinktion wurde bei 552 nm und 508 nm mit einem Zeiss-Photometer (PMQ II-M4Q III) gemessen. Der Prozentgehalt von 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO) wird mit folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ KDO} = \frac{\Delta E \times 0.238}{0.13 \times \text{Vol} \times \text{Einwaage in mg}}$$

ΔE = Extinktionsdifferenz bei 552 nm und 508 nm
Vol = eingesetztes Probenvolumen

Über den ermittelten KDO-Gehalt läßt sich die Menge LPS berechnen, die beispielsweise in der äußeren Membran vorhanden ist, da bekannt ist, daß 1 mg LPS von E. coli B/r 0.086 mg KDO enthält (21).

b) Aminosäure-Analyse

Circa 2-3 mg LPS wurden in 3 ml 6 N Salzsäure unter Vakuum bei 110 °C 24 Std. hydrolysiert. Die Salzsäure wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in einem geeigneten Volumen des Probenpuffers für den Analysator aufgenommen. Die Aminosäure-Analysen wurden mit dem Multichrom B Column Chromatograph 4255 der Firma Beckman durchgeführt.

c) pH-Titration

Vorgelegt wurden 5 ml einer 110 µM LPS-Suspension in Wasser. Das verwendete LPS hat ein Molekulargewicht von 9 000 bezogen auf ein Mol Diglucosamin pro LPS-Molekül (21).

Titriert wurde in Schritten zu je 2 µl einer 0.1 N Salzsäure bzw. Natronlauge. Gemessen wurde der pH-Wert mit einer Glaselektrode bei 20 °C mit dem pH-Meter 26 der Firma Radiometer, Kopenhagen. Nach jeder Zugabe von Säure bzw. Lauge wurde jeweils eine Minute gewartet, bis sich unter Rühren das Gleichgewicht eingestellt hatte.

3. Methoden zur Bestimmung der Phasenumwandlung

a) Fluorimetrie

Als Fluoreszenzindikator wurde N-Phenyl-1-naphthylamin (NPN) verwendet. Eine 1 mM NPN-Lösung in Methanol wurde einmal monatlich hergestellt und bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Der Fluoreszenzindikator wurde jeweils zu 3 ml einer wässrigen Probenlösung gegeben. Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzintensität I wurde bei zu- und abnehmender Temperatur aufgezeichnet, wobei die Temperaturänderung etwa 1 °C/Min. betrug. Die Abkühlung der Probe wurde durch den Durchfluß eines Kühlmittels durch den Küvettenhalter bewerkstelligt, während die Aufheizung entweder direkt oder mit einem Peltier-Element erfolgte. Die Temperaturänderung in der Küvette wurde direkt mit einem Thermoelement gemessen.

Zur Fluoreszenzmessung wurde das Perkin-Elmer-Fluorescence-Spectrometer MPF-3, zur Aufzeichnung der Hewlett-Packard X-Y Recorder 7001 AM verwendet. Die Messung erfolgte bei folgender Einstellung des Gerätes:

Anregungswellenlänge 350 nm, Schlitzbreite 3 nm
Emissionswellenlänge 450 nm, Schlitzbreite 3 nm.
Um konstante Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gerät vor jeder Meßreihe mittels eines Fluoreszenzstandards geeicht.

b) Lichtstreuung

Zur Messung der Lichtstreuung wurden die oben beschriebenen Geräte verwendet. Das Probenvolumen war ebenfalls 3 ml. Die Lichtstreuung wurde bei einer Wellenlänge von 400 nm und einer Schlitzbreite von circa 1.5 nm gemessen.

c) Auswertung der Umwandlungskurven (18,19)

Die Auswertung der Phasenumwandlung erfolgte graphisch. In Abbildung 5 ist die Ermittlung der einzelnen Parameter der Phasenumwandlung schematisch dargestellt.

Die Senkrechte AB wurde solange zwischen den an den Kurvenschenkeln angelegten Tangenten verschoben, bis die Strecken AC und CB, die durch den Schnittpunkt der Senkrechten mit der Kurve entstehen, gleich lang waren. Die Verlängerung der Senkrechten in dieser Position auf die Temperaturachse, in der Abbildung als gestrichelte Linie dargestellt, ergibt die Umwandlungstemperatur (T_t = 22 °C).

Die Breite der Phasenumwandlung ΔT wurde durch Anlegen einer Geraden im Punkt C an die Steigung der Kurve ermittelt, indem die Temperaturwerte der Schnittpunkte mit den Tangenten

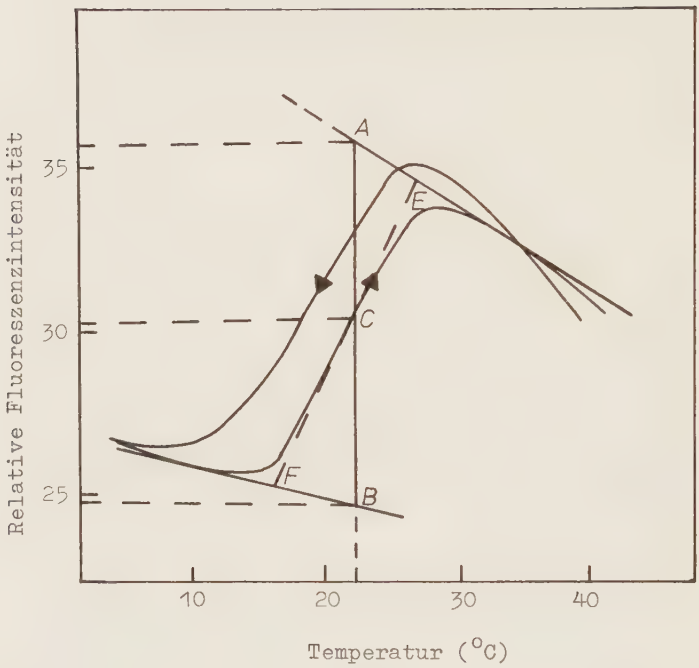


Abb. 5 Graphische Ermittlung der verschiedenen Parameter der Phasenumwandlung

(E und F) voneinander abgezogen wurden. Die Umwandlungsbreite ΔT beträgt im obigen Beispiel 9 °C.

Die Änderung der Intensität ΔI während der Phasenumwandlung ist durch die Differenz der Intensitäten im Punkt A und B, die durch die Projektion auf die Intensitätsachse gefunden wurden, gegeben.

ΔI beträgt im Beispiel 11 Einheiten. Die mittlere Intensität I wird durch Projektion des Punktes C auf dieselbe Achse gefunden und beträgt 30.5 Einheiten. Daraus berechnet sich ein Quotient $\Delta I/I$ von 0.36.

C. ERGEBNISSE

I. Phasenumwandlung von isoliertem LPS

Im folgenden Abschnitt wird die Phasenumwandlung des isolierten LPS in Abhängigkeit verschiedener Faktoren beschrieben.

1. Messung der Phasenumwandlung mit Fluorimetrie

Die Phasenumwandlung wurde mittels der Intensitätsänderung des Fluoreszenzindikators N-Phenyl-1-naphthylamin (NPN) bei Temperaturzu- und -abnahme gemessen.

a) Elektrodialyse von LPS

Entsprechend einer Vorschrift von Galanos und Lüderitz (26) wurde das LPS der Elektrodialyse unterworfen.

Das LPS setzte sich nach etwa 90 Minuten an der Anode als Gel ab. In der Kathodenkammer veränderte sich der pH-Wert im Gegensatz zur Literaturangabe kaum. Trotzdem wurde das bidestillierte Wasser dreimal in entsprechenden Abständen erneuert. Während der Dialysedauer wurde das an der Dialysemembran abgesetzte LPS dreimal aufgeschüttelt. Am Ende wurde das LPS von der Anodenmembran mit Wasser abgespült. Nach der Elektrodialyse wurde eine geringgradige pH-Änderung der wässrigen LPS-Suspension festgestellt. Von pH 5 vor der Dialyse fiel der pH-Wert nach der Dialyse auf 4 ab.

α) Phasenumwandlung von LPS nach Elektrodialyse

Einen Vergleich der Parameter der Phasenumwandlungen des LPS vor und nach der Elektrodialyse gibt Tabelle 2 wieder.

LPS	T_t(°C)	ΔT(°C)	ΔI/I
vor der Elektrodialyse	23 ± 1	6 ± 1	0.3
nach der Elektrodialyse	23 ± 1	9 ± 1	0.8

Tab. 2 Vergleich der Parameter der Phasenumwandlung von LPS vor und nach Elektrodialyse. Die Umwandlungen wurden mit abnehmender Temperatur gemessen.

Aus der obigen Tabelle ist zu entnehmen, daß sich die Umwandlungstemperatur durch die Elektrodialyse nicht verändert hat. Die Umwandlungsbreite ist nachher etwas größer. Am auffälligsten ist jedoch die Zunahme des Intensitätsquotienten ΔI/I auf nahezu den dreifachen Wert.

Galanos und Lüderitz (26) hatten gefunden, daß durch die Elektrodialyse Natrium- und Magnesiumionen vom LPS abgetrennt wurden, während sich der Gehalt an Ketodesoxyoctonat und Glucosamin nicht veränderte. Die Magnesiumionen bewirken, wie auf Seite 29 gezeigt wird, eine Verkleinerung des Quotienten ΔI/I. Folglich könnte die Entfernung von elektrostatisch gebundenen Magnesiumionen umgekehrt die beobachtete Zunahme von ΔI/I bewirken.

ß) Analyse von LPS vor und nach Elektrodialyse

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung der analytischen Daten des LPS vor und nach der Elektrodialyse:

LPS	vor Elektrodialyse	nach Elektrodialyse
Glycin	0.12 µMol/mg LPS	0.10 µMol/mg LPS
Glucosamin	0.25 µMol/mg LPS	0.26 µMol/mg LPS
KDO	93 µg/mg LPS	91 µg/mg LPS

Tab. 3 Vergleich von drei analytischen Untersuchungen von LPS vor und nach Elektrodialyse.

Verglichen mit früheren analytischen Daten (21) liegt der Wert für Glycin (0.15 µMol/mg LPS) etwas zu niedrig und der Wert für KDO (86 µg/mg LPS) etwas zu hoch. Wichtig an der obigen Tabelle ist jedoch, daß sich die Werte vor und nach der Elektrodialyse praktisch nicht unterscheiden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Galanos und Lüderitz (26) gut überein.

Das Verfahren der Elektrodialyse wurde erst im Laufe der Experimente für diese Arbeit bekannt, so daß der größere Teil der Versuche mit nicht dialysiertem LPS gemacht wurde. Die Anwendung dieses Reinigungsschrittes bewies jedoch, daß das bisher verwendete LPS schon sehr rein war.

b) pH-Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur

α) pH-Titration von LPS

Die Titrationskurve in Abbildung 6 zeigt einen schwachen Knick bei pH 8.5, der wahrscheinlich auf eine geringe Pufferwirkung der Aminogruppen im LPS zurückzuführen ist. Mögliche Kandidaten für diese Pufferwirkung sind Glycin und Äthanolamin.

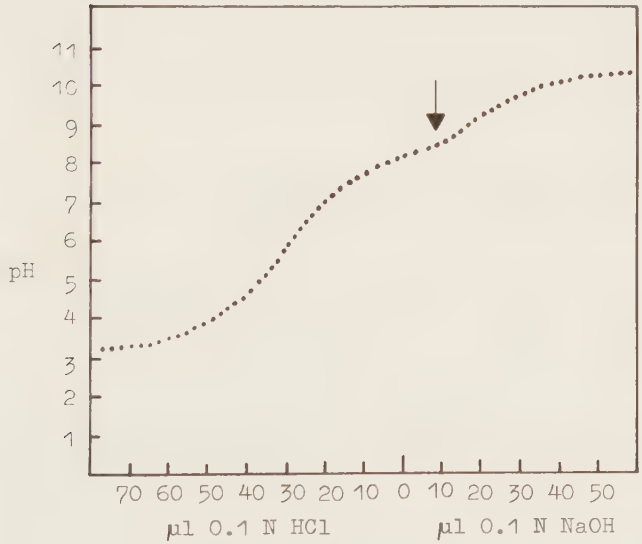


Abb. 6 pH-Titration einer 110 µM LPS-Suspension in 5 ml Wasser.

Titriert wurde in Schritten von je 2 µl 0.1 N HCl bzw. NaOH. Der Pfeil weist auf die Pufferwirkung durch die Aminogruppen hin.

ß) Phasenumwandlung in Abhängigkeit vom pH

Abbildung 7 zeigt die pH-Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur. Der kleine Temperatursprung von 1 °C kommt durch einen Unterschied der Umwandlungstemperaturen der beiden LPS-Proben zustande. Dies entspricht der Schwankungsbreite, die bei verschiedenen Messungen beobachtet wurde.

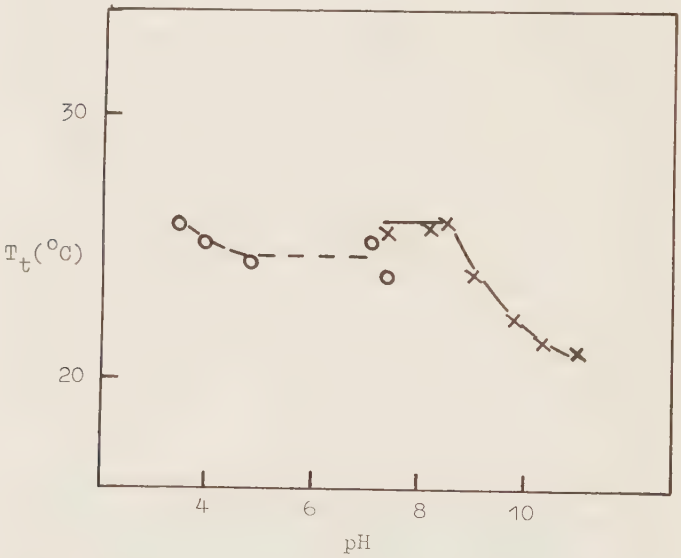


Abb. 7 Phasenumwandlungstemperatur T_t als Funktion des pH-Wertes.

Suspension von 37 µM LPS in Wasser. Die Phasenumwandlung wurde mit zunehmender Temperatur gemessen. (o) und (x) geben verschiedene Proben an.

Die Abbildung 7 zeigt einen deutlichen Abfall der Umwandlungstemperatur im alkalischen Bereich, beginnend bei pH 8. In diesem pH-Bereich wird die Ionisierung der Aminogruppen aufgehoben. Das könnte für die Senkung der Umwandlungstemperatur verantwortlich sein. Im neutralen Bereich bleibt T_t konstant, während es im sauren Bereich schwach ansteigt. Die Breite der Phasenumwandlung ΔT änderte sich bei der pH-Änderung nicht in eindeutiger Weise und lag bei 12 $\pm$ 1 °C. Die Intensitätsänderung ΔI ist im neutralen Bereich am größten, während sie sowohl in saurer wie auch alkalischer Richtung kontinuierlich bis auf die Hälfte des bei neutralem pH gemessenen Wertes abnahm.

c) Phasenumwandlung in Gegenwart von Kationen

α) Einwertige Kationen

Abbildung 8 zeigt den Einfluß von Natriumchlorid auf die Umwandlungstemperatur bei pH 7 und 8.

Aus dieser Abbildung ist zu ersehen, daß Natriumchlorid mit steigender Konzentration kontinuierlich die Umwandlungstemperatur des LPS senkt. Der Temperaturabfall ist im Bereich niedriger Salzkonzentrationen steiler und flacht mit höheren Konzentrationen ab. Die Temperaturerniedrigung beträgt bei 0.5 M Natriumchlorid etwa 5 °C. Die Temperaturerniedrigung ist bei pH 8 im Anfangsteil etwas ausgeprägter als bei pH 7. Die Fluoreszenzänderung ΔI zeigt nur eine geringe Abnahme bei Zugabe von Natriumchlorid, während die Umwandlungsbreite ΔT konstant bleibt und etwa 10 °C bei beiden pH-Werten

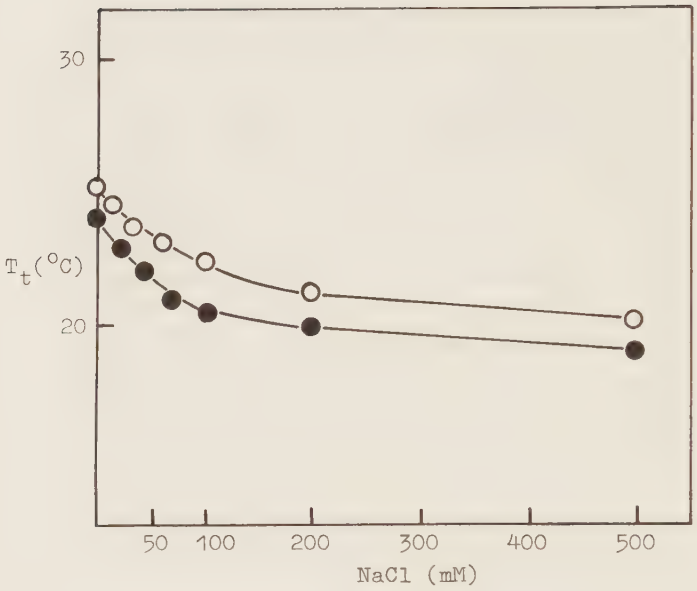


Abb. 8 Abhängigkeit der Phasenumwandlungstemperatur von der Natriumchlorid-Konzentration. Suspension von 32 µM LPS in: (o) 4 mM Tris-HCl pH 7.0; (•) 10 mM Tris-HCl pH 8.0. T_t wurde mit steigender Temperatur gemessen. NPN 10 µM.

beträgt. Die optische Dichte bei 400 nm ändert sich bis zu einer Konzentration von 0.2 M NaCl nicht und steigt bei 0.5 M NaCl sprunghaft an.

Zugabe von Natriumchlorid zu LPS ohne Pufferung der Probe führt zu einer Erniedrigung des pH-Wertes, was für eine Freisetzung von Protonen durch die Natriumionen spricht.

ß) Zweiwertige Kationen

Abbildung 9 zeigt den Einfluß von Magnesium- und Calciumionen auf die Umwandlungstemperatur.

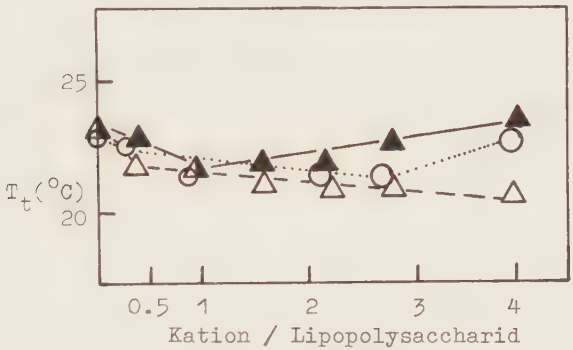


Abb. 9 T_t in Abhängigkeit von der Magnesium- und Calcium-Konzentration.
Suspension von 37 µMol LPS in 5 mM Tris-HCl pH 7.4:
(▲) $MgCl_2$; (△) $MgSO_4$; (○) $CaCl_2$.

Wie aus dieser Darstellung ersichtlich ist, haben weder Magnesium- noch Calciumionen im gemessenen Bereich einen eindeutigen Einfluß auf die Umwandlungstemperatur. Der einzige Effekt, der durch die zweiwertigen Kationen bewirkt wird, betrifft die Änderung der Fluoreszenzintensität ΔI während der Phasenumwandlung. ΔI nimmt bei molaren Verhältnissen von Magnesium- und Calciumionen pro LPS im Bereich von 0 bis 1 leicht zu und wird bei höheren Ionenkonzentrationen signifikant kleiner. Dies ist in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

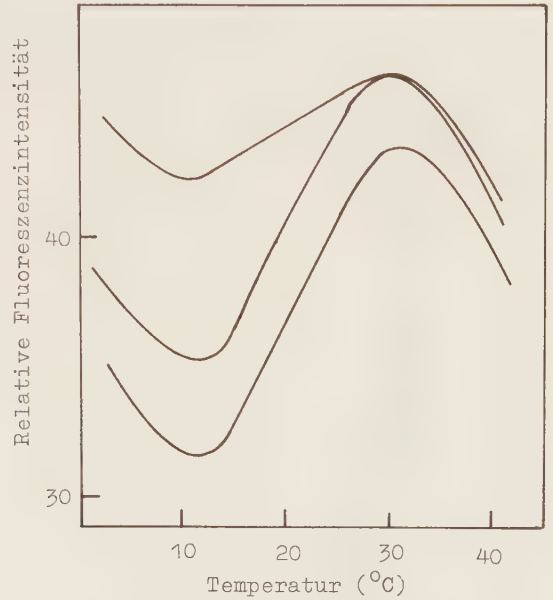


Abb. 10 Einfluß der Mg^{++}-Konzentration auf die Phasenumwandlung von LPS.

Suspension von 37 µMol LPS:
(a) ohne $MgCl_2$; (b) 33 µM $MgCl_2$;
(c) 100 µM $MgCl_2$.

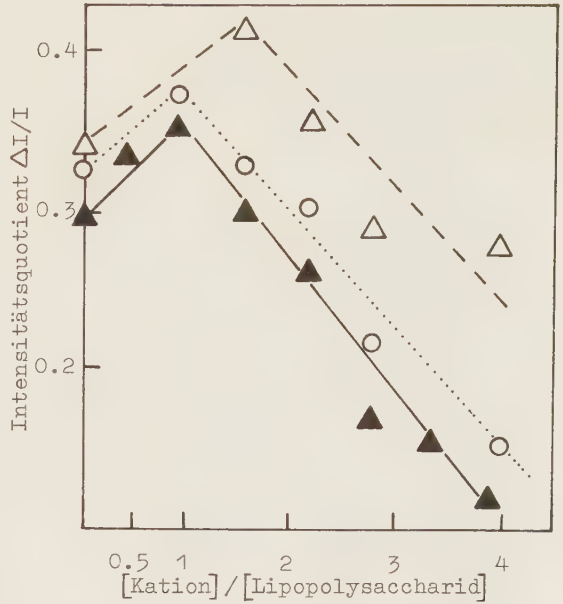


Abb. 11 Einfluß von Mg^{++} und Ca^{++} auf den Quotienten ΔI/I.

Suspension vor 37 µM LPS in 5 mM Tris-HCl pH 7.4: (▲) $MgCl_2$; (△) $MgSO_4$; (○) $CaCl_2$.

2. Messung der Phasenumwandlung mit Lichtstreuung

Nachdem ein Teil der Messungen der Phasenumwandlung von LPS mit Fluorimetrie durchgeführt worden war, hat sich gezeigt, daß diese ebenfalls mit Lichtstreuung gemessen werden kann.

a) Phasenumwandlung von LPS

Abbildung 12 zeigt die Phasenumwandlung von isoliertem LPS, die mit Lichtstreuung gemessen wurde.

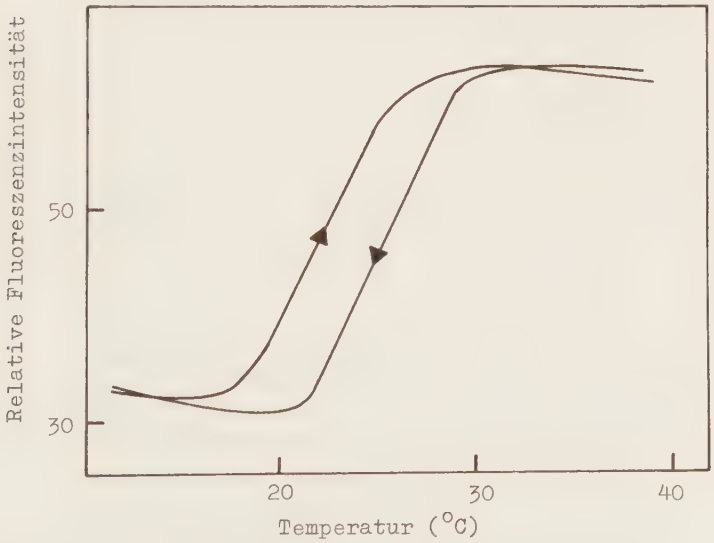


Abb. 12 Phasenumwandlung von LPS bei zu- und abnehmender Temperatur mit Lichtstreuung bei 400 nm und einer Schlitzbreite von 1.5 nm gemessen.
Die Pfeilspitzen geben den Temperaturverlauf während der Messung an.
Suspension von 40 µM LPS in Wasser.

b) Vergleich von Lichtstreuung und Fluorimetrie

Eine Zusammenstellung der Parameter der Phasenumwandlung von LPS, die mit Lichtstreuung und Fluorimetrie gemessen wurde, zeigt die untenstehende Tabelle:

Meßmethode	T_t(°C)	ΔT(°C)	$\Delta I/I$
Lichtstreuung (vgl. Abb. 12)	23 ± 1	6 ± 1	0.5
Fluorimetrie (vgl. Abb. 4)	22 ± 1	7 ± 1	0.3

Tab. 4 Vergleich der Messung der Phasenumwandlung von LPS mit Fluorimetrie und Lichtstreuung.
Suspension von 40 µM LPS in Wasser.

Der Vergleich der Phasenumwandlungen, mit Lichtstreuung und Fluorimetrie gemessen, zeigt kaum Unterschiede bezüglich der Umwandlungstemperatur und -breite, jedoch ist das Verhältnis $\Delta I/I$ bei Messung mit Lichtstreuung größer. Daraus folgt, daß man mit beiden Methoden die Phasenumwandlung messen kann, wobei die Lichtstreuung den Vorteil hat, daß kein Indikator zugefügt werden muß, der ja möglicherweise eine Störung der Umwandlung hervorrufen könnte.

c) Phasenumwandlung in Abhängigkeit der Beschallzeit

Die Probenlösung von 1 mg LPS/3 ml Wasser wurde sukzessiv mit Ultraschall behandelt und nach jeder Beschalldauer erneut gemessen. Dadurch änderte sich weder die Umwandlungstemperatur noch die Breite der Umwandlung. Die Intensitätsänderung bezogen auf die Ausgangsintensität nimmt jedoch nahezu exponentiell ab, wie aus Abbildung 13 zu ersehen ist.

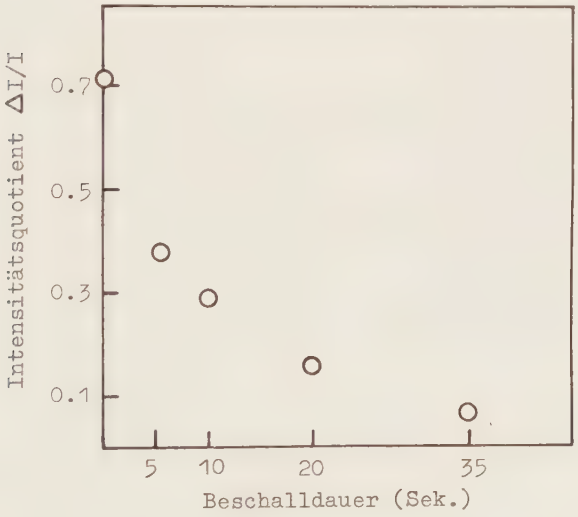


Abb. 13 Änderung des Intensitätsquotienten ΔI/I durch die Behandlung mit Ultraschall.
Die Probenlösung wurde im Eisbad bei etwa 4 Ampère mit einem Branson Sonifier beschallt und mit Lichtstreuung gemessen.

II. Phasenumwandlung von Hüllenpräparationen und Membranfraktionen

Über die Anordnung des LPS in der äußeren Membran gibt es einige Hinweise, die aus Untersuchungen von Salmonella typhimurium gewonnen wurden (5,6):

Zum einen kann LPS in der äußeren Membran lateral diffundieren. Zweitens ist es asymmetrisch und wahrscheinlich ausschließlich in der Außenschicht der äußeren Membran angeordnet und schließlich ist, wenn man von einer statistischen Verteilung ausgeht, nicht genügend LPS in der äußeren Membran vorhanden um eine zusammenhängende Lipidschicht bilden zu können. Außerdem wird diskutiert, ob auch das Phospholipid der äußeren Membran von Salmonella typhimurium asymmetrisch, und zwar nur in der inneren Schicht dieser Membran angeordnet ist (37).

Ausgehend von den Ergebnissen der thermischen Phasenumwandlung von isoliertem LPS wurde nun versucht, mehr über die Anordnung von LPS in der Zellmembran und die Wechselwirkung mit anderen Komponenten der Bakterienmembran, wie z.B. Phospholipid, zu erfahren. Zu diesem Zweck wurde die Phasenumwandlung verschiedener Membranpräparationen unterschiedlicher Bakterienstämme gemessen. Der Verlauf der Umwandlungskurven und die Umwandlungstemperaturen wurden miteinander und mit der des isolierten LPS verglichen, um möglicherweise Aussagen bezüglich Anordnung und Wechselwirkung des LPS in der

Bakterienwand machen zu können.

Da die Zellwand intakter Gram-negativer Bakterien in Wasser mit NPN als Indikator keine oder nur eine sehr breite, uncharakteristische Phasenumwandlung zeigte, wurden Zellwandpräparationen für die Messungen verwendet und zwar Hüllen, die nur aus äußerer Membran, der Mureinschicht und Bruchstücken der Cytoplasmamembran bestehen und Präparationen von äußerer Membran und Cytoplasmamembran. Letztere werden auch Membranfraktionen genannt.

1. Phasenumwandlung der Membranfraktionen

Mit Hilfe einer von Osborn (33) beschriebenen Methode gelingt es, die äußere Membran von der inneren Cytoplasmamembran zu trennen. Dadurch wird es möglich, die Phasenumwandlungen beider Membranen der Zellwand getrennt zu messen und auch den Gehalt an LPS in beiden durch die Bestimmung der Konzentration von Ketodesoxyoctonsäure zu ermitteln.

Durch die Einwirkung von Lysozym und EDTA auf eine Bakteriensuspension entstehen Sphäroplasten, die anschließend mit Ultraschall behandelt und einer isopyknischen Gleichgewichtszentrifugation in einem Sucrose-Dichtegradienten unterworfen werden. Man erhält auf diese Weise drei Banden, in denen verschiedene Membranfraktionen angereichert sind: eine L-Bande, die die Cytoplasmamembran enthält und die geringste Dichte aufweist, eine M-Bande mit Cytoplasmamembran und äußerer

Membran und eine H-Bande mit äußerer Membran.

Ein Teil der Membranfraktionen wurde lyophilisiert und anschließend mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1 v/v) extrahiert um die Phospholipide aus den Membranen zu entfernen.

a) Membranfraktionen von E. coli B/r

Als erstes wurden die Phasenumwandlungen der Membranfraktionen von E. coli B/r, dem Bakterienstamm, aus dem das LPS isoliert wurde, gemessen.

Membranfraktionen	T_t(°C)	ΔT(°C)	$\Delta I/I$
Cytoplasmamembran	ca. 3	n.b.	n.b.
Cytoplasmamembran nach Lyophilisation	ca. 3	n.b.	n.b.
Cytoplasmamembran nach CM-Extraktion	keine Phasenumwandlung		
Äußere Membran	21	17	0.18
Äußere Membran nach Lyophilisation	23	18	0.15
Äußere Membran nach CM-Extraktion	keine Phasenumwandlung		

Tab. 5 Phasenumwandlung der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran von E. coli B/r.

NPN-Konzentration: 10 µM.
Der LPS-Gehalt der äußeren Membran betrug 36 Gewichtsprozent.
Abkürzungen: CM = Chloroform-Methanol
n.b. = nicht bestimmbar, wegen zu tiefer Umwandlungstemperatur.

b) Membranfraktionen von E. coli P 400 und und P 692-2d

E. coli P 692-2d ist eine Mutante des Wildtyps K12 P 400 (28,29). Der Mutante fehlen in der äußeren Membran die Hauptproteine I und II* mit einem Molekulargewicht von 38 000 bzw. 33 000. Der Proteingehalt macht bezogen auf das Trockengewicht für P 400 36.5%, für P 692-2d aber nur 22.6% aus. Ausgeglichen wird der Unterschied durch einen höheren Phospholipidgehalt der Mutante. Daraus errechnet sich ein Phospholipid/Protein-Quotient von 0.96 für P 400 und ein solcher von 2.2 für P 692-2d. Der Quotient von P 692-2d entspricht in etwa jenem, den man für Cytoplasmamembranen erhält. Der LPS-Gehalt beider äußerer Membranen ist nahezu identisch und liegt bei etwa 32% (39).

Hat die unterschiedliche Zusammensetzung der äußeren Membran (H-Bande) von E. coli P 400 und der Proteinmutante P 692-2d eine Änderung der Phasenumwandlung zur Folge?

In den Tabellen 6 und 7 sind die Daten für die verschiedenen Parameter der Phasenumwandlungen zusammengestellt:

Membranfraktionen	T_t(°C)	ΔT(°C)	ΔI/I
Cytoplasmamembran (L-Bande)	ca. 7	n.b.	n.b.
Cytoplasmamembran mit äußerer Membran (M-Bande)	29	15	0.2
Äußere Membran (H-Bande)	33	12	0.1

Tab. 6 Phasenumwandlungen der Membranfraktionen von E. coli P 400.
NPN-Konzentration: 3 µM.
n.b. = nicht bestimmbar.

Membranfraktionen	T_t(°C)	ΔT(°C)	ΔI/I
Cytoplasmamembran (L-Bande)	ca. 8	n.b.	n.b.
Cytoplasmamembran mit äußerer Membran (M-Bande)	34	20	0.1
M-Bande nach CM-Extraktion	keine Phasenumwandlung		
Äußere Membran (H-Bande)	38	20	0.26
Äußere Membran nach CM-Extraktion	keine Phasenumwandlung		

Tab. 7 Phasenumwandlungen der Membranfraktionen von. E. coli P 692-2d.
NPN-Konzentration: 10 µM.
n.b. = nicht bestimmbar;
CM = Chloroform-Methanol.

In Tabelle 8 sind zur besseren Übersicht die Umwandlungstemperaturen der verschiedenen Präparationen nochmals gegenübergestellt:

Bakterienstämme	Umwandlungstemperaturen (°C) L-Bande	M-Bande	H-Bande
E. coli B/r	ca. 3	n.g.	21
E. coli P 400	ca. 7	29	33
E. coli P 692-2d	ca. 8	34	38

Tab. 8 Zusammenstellung der Umwandlungstemperaturen der Membranfraktionen verschiedener Bakterienstämme.
n.g. = nicht gemessen.

Aus Tabelle 8 ist zu ersehen, daß die Umwandlungstemperaturen der Cytoplasmamembran (L-Bande) und der äußeren Membran (H-Bande) sehr unterschiedlich sind. Dies ist natürlich bedingt durch die unterschiedliche Zusammensetzung dieser beiden Membranen. Die Cytoplasmamembran besitzt zum größten Teil Phospholipide, deren Umwandlungstemperatur ungefähr bei 0 °C liegt. Die äußere Membran besteht dagegen zu etwa 50% aus Protein, zu etwa 20-40% aus LPS und nur zu etwa 15% aus Phospholipiden (7). Hinzu kommt, daß auch die Phospholipidzusammensetzung in beiden Membranen noch verschieden ist. Die signifikant höhere Umwandlungstemperatur der äußeren Membran wird möglicherweise

durch eine Wechselwirkung von LPS- und Phospholipidmolekülen, wobei auch noch an eine zusätzliche Mitwirkung von Proteinmolekülen zu denken wäre, bedingt. Auch die M-Bande, die ja sowohl Cytoplasmamembran als auch äußere Membran enthält, zeigt nur eine einzige Phasenumwandlung. Die Umwandlungstemperatur liegt zwischen der für die Cytoplasma- und äußeren Membran, ist jedoch deutlich zur äußeren Membran hin verschoben.

Die Umwandlungstemperatur der Cytoplasma- und äußeren Membran von E. coli B/r liegt bei deutlich niedrigeren Werten als die von E. coli P 400 und P 692-2d, wobei auffällt, daß die Umwandlungstemperatur der äußeren Membran von E. coli B/r genau mit der des isolierten LPS übereinstimmt.

Der Vergleich von E. coli P 400 und der Proteinmutante P 692-2d zeigt, daß die Fraktion der äußeren Membran von P 692-2d eine um 5 °C höhere Umwandlungstemperatur hat, obwohl die äußere Membran der Mutante einen höheren Phospholipidanteil aufweist, was eine niedrigere Umwandlungstemperatur erwarten ließe. Die M-Banden, also die Bruchstücke von Cytoplasma- und äußerer Membran verhalten sich entsprechend und liegen jeweils 4 °C unterhalb der Umwandlungstemperatur der äußeren Membran.

Werden die Phospholipide durch eine Chloroform-Methanol-Extraktion entfernt, so verschwindet die Phasenumwandlung überall vollständig.

2. Phasenumwandlung von Hüllen

Hüllen, die man durch hochfrequentes Schütteln einer Aufschwemmung von Bakterien und winzigen Glasperlen in Wasser unter Kühlung mit Kohlendioxidschnee erhält (32), bestehen aus äußerer Membran, der Mureinschicht und Bruchstücken der Cytoplasmamembran. Sie stehen damit den Bakterienzellen morphologisch näher als die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Membranfraktionen.

Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war die Frage, ob LPS-LPS oder LPS-Phospholipid Wechselwirkungen in den Hüllenpräparationen durch Messung der Phasenumwandlung nachgewiesen werden können. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluß die Behandlung der Hüllen mit Lysozym und EDTA, zwei Substanzen die entsprechend einer Vorschrift von Osborn (33) für die Präparation der Cytoplasma- und der äußeren Membran aus Bakterienzellen notwendig sind, auf die Phasenumwandlung haben würde. Wenn möglich sollte dadurch auch Aufschluß darüber erhalten werden, ob sich das LPS in der äußeren Membran nach enzymatischem Abbau der Mureinschicht mit Lysozym anders anordnen würde, da Mühlradt durch Versuche mit radioaktiv markiertem LPS gefunden hatte, daß dieses in der H-Bande (äußere Membran) auf beiden Seiten der Doppelschicht angeordnet ist im Gegensatz zu den Hüllen, wo es nur an der Außenseite vorkommt (6).

Um einen Vergleich mit den Ergebnissen der Phasenumwandlungen der Membranfraktionen anstellen zu können, wurden die Umwandlungen der Hüllen von E. coli B/r und der Proteinmutante P 692-2d gemessen und anschließend die Weiterbehandlung mit Lysozym und EDTA durchgeführt. Zusätzlich wurden noch Hüllen einer Fettsäure-Mutante gemessen, die durch Substitution mit geeigneten Fettsäuren eine Umwandlung in einem engen, gut meßbaren Temperaturbereich zeigten, wodurch der Einfluß von LPS auf die Phasenumwandlung und Änderungen, die durch die Behandlung mit Lysozym und EDTA hervorgerufen würden, besser zu beurteilen sein sollten.

a) Hüllen von E. coli B/r

Die Hüllenpräparation erfolgte nach einer Vorschrift von Braun et al. (32).

In Tabelle 9 sind die einzelnen Behandlungsschritte angegeben, die mit den Hüllen ausgeführt wurden und die Meßergebnisse der Phasenumwandlungen nach den jeweiligen Präparationsstufen zusammengestellt.

Der Vergleich der Werte der Hüllen, die nur zwei Stunden gerührt worden waren mit denen, die nach Zugabe von Lysozym zwei Stunden gerührt worden waren zeigt, daß diese praktisch identisch sind. Zugabe von EDTA, das zweiwertige Kationen in einem Chelatkomplex bindet und diese damit aus der vorherigen Bindung entfernt, hat sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C

Behandlung der Hüllen	T_t(°C)	ΔT(°C)	ΔI/I
(1) 2 Std. bei RT	29	21	0.12
(2) Lysozym 2 Std. bei RT	30	22	0.12
(3) EDTA 1 Std. bei RT	26	18	0.14
(4) EDTA 2 Std. bei RT	24	18	0.19
(5) EDTA 2 Std. bei 4 °C	26	14	0.13
(6) wie (2) jedoch zusätzlich Chloroform-Methanol Extraktion	keine Phasenumwandlung		
(7) wie (4) jedoch zusätzlich Chloroform-Methanol Extraktion	keine Phasenumwandlung		

Tab. 9 Phasenumwandlungen der verschiedenen Präparationsstufen der Hüllen von E. coli B/r.

Die optische Dichte der Hüllensuspensionen in Wasser war 0.6 gemessen bei einer Wellenlänge von 436 nm. Die Phasenumwandlungen der Hüllenpräparationen wurden bei abnehmender Temperatur mit einer NPN-Konzentration von 10 µM gemessen. Die Präparationen wurden während der angegebenen Zeit gerührt.

Abkürzungen: Std. = Stunde; RT = Raumtemperatur.

eine Erniedrigung der Umwandlungstemperatur und eine Verkleinerung der Umwandlungsbreite zur Folge. Nach der Behandlung der lyophilisierten Hüllen mit einer Chloroform-Methanol-Mischung, durch die die Phospholipide herausgelöst werden, ist keine Phasenumwandlung mehr nachweisbar.

b) Hüllen von E. coli P 692-2d

Die in Tabelle 10 wiedergegebenen Werte wurden für die Phasenumwandlung der Proteinmutante erhalten:

Behandlung der Hüllen	T_t(°C)	ΔT(°C)	$\Delta I/I$
(1) 2 Std. bei RT	ca. 10	n.b.	n.b.
(2) Lysozym 2 Std. bei RT	36	22	0.09
(3) EDTA 2 Std. bei RT	31	13	0.28
(4) Lysozym und EDTA 2 Std. bei RT	28	17	0.30

Tab. 10 Zusammenstellung der Phasenumwandlungen der verschiedenen Präparationsstufen der Hüllen von E.coli P 692-2d. OD_{436} = 0.5; NPN-Konzentration: 1 µM. Messung der Phasenumwandlungen mit abnehmender Temperatur.
Abk.: Std. = Stunde; RT = Raumtemperatur; n.b. = nicht bestimmbar, wegen zu tiefer Umwandlungstemperatur.

Auffallend bei den Daten der Tabelle 10 ist der niedrige Ausgangswert für die Phasenumwand-

lungstemperatur der Hüllen ohne weitere Behandlung. Dazu ist zu bemerken, daß die Phasenumwandlungen bei den beiden Stämmen E. coli B/r und P 692-2d nicht immer reproduzierbar waren. Bei drei verschiedenen Hüllenpräparationen von E. coli P 692-2d, die eine Phasenumwandlung zeigten, lag die Umwandlungstemperatur jedoch bei ca. 10 °C. Nach Zugabe von Lysozym und vor allem EDTA war aber immer eine eindeutige Phasenumwandlung nachweisbar. Die Phasenumwandlungen lagen jedoch nach dieser Behandlung bei deutlich höheren Temperaturen. Die Umwandlungsbreite hatte abgenommen und das Verhältnis $\Delta I/I$ nahm nach Behandlung mit EDTA signifikant zu.

c) Vergleich der Membranfraktionen mit den Hüllenpräparationen

In Tabelle 11 sind die Werte der Phasenumwandlungen der Hüllenpräparationen und der äußeren Membran von E.coli B/r gegenübergestellt:

E. coli B/r	T_t(°C)	ΔT(°C)
Hüllen	29	21
Hüllen nach Lysozym-Behandlung	30	22
Hüllen nach EDTA-Behandlung	25	17
Äußere Membran (H-Bande)	22	17

Tab. 11 Gegenüberstellung von Hüllenpräparation und äußerer Membran von E. coli B/r.

Die Gegenüberstellung zeigt, daß die äußere

Membran bezüglich der Umwandlungstemperatur und der Breite der Umwandlung am ehesten mit den Hüllen nach Behandlung mit EDTA vergleichbar ist. Dies ist auch zu erwarten, da für die Isolierung der äußeren Membran ebenfalls EDTA verwendet wurde. Welche Änderungen durch die Behandlung der Hüllen mit Lysozym oder EDTA vor sich gehen, läßt sich aufgrund dieser Messungen nicht sagen. Festzuhalten bleibt jedoch, daß die stärksten Veränderungen der Phasenumwandlung durch Zugabe von EDTA bewirkt werden. Für die Proteinmutante P 692-2d fällt der Vergleich entsprechend aus.

d) Elaidinsäure-Hüllen von E. coli K 1062

Wie bereits erwähnt, waren die Phasenumwandlungen der Hüllen von E. coli B/r und P 692-2d nicht immer reproduzierbar. Außerdem waren die Umwandlungen sehr breit, was durch die Lipidzusammensetzung bedingt sein könnte. Es war daher wünschenswert, bezüglich der Beurteilung der LPS-Phospholipid-Wechselwirkungen Hüllen mit einer definierten Lipidzusammensetzung als Ausgangsmaterial zu verwenden, deren Phasenumwandlung zudem noch in einem gut meßbaren und von der Umwandlungstemperatur des isolierten LPS unterschiedlichen Bereich liegt.

Dafür bot sich eine Mutante von E.coli K 12 an. Diese als E. coli K 1062 geführte Mutante kann nur in einem Medium wachsen das Fettsäuren enthält, da sie selbst keine synthetisieren kann. Die jeweils angebotene Fettsäure wird von

der Mutante eingebaut und macht den Hauptbestandteil der Fettsäuren der Membranphospholipide aus (30). So beträgt beispielsweise der Anteil der Elaidinsäure etwa 90% und der der Ölsäure etwa 60% des Gehaltes an Fettsäuren im Phospholipid der Zellwand (31). Die isolierten Phospholipide aus E. coli K 1062, die in einem Ölsäure-Medium gewachsen waren, hatten eine Umwandlungstemperatur von 17 °C, die entsprechenden in einem Elaidinsäure-Medium gewachsenen eine solche von 39 °C.

In Tabelle 12 sind die Parameter der Phasenumwandlung der Hüllen von E. coli K 1062, das mit Elaidinsäure substituiert worden war, wiedergegeben.

E.coli K1062/Elaidinsäure	T_t(°C)	ΔT(°C)	ΔI/I
(1) Zellen	40	6	0.2
(2) Hüllen	40	7	0.2
(3) Hüllen mit EDTA behandelt 1 Std. bei 4 °C gerührt	37	7	0.3

Tab. 12 Hüllenpräparationen von E.coli K 1062 mit Elaidinsäure substituiert.

Optische Dichte bei 436 nm = 0.7; NPN-Konzentration: 1 µM; Messung mit zunehmender Temperatur.

Charakteristisch für diese Präparationen ist der schmale Temperaturbereich der Phasenumwandlung, der nur etwa halb so breit ist wie der-

jenige der Hüllen von E. coli B/r. Die Meßwerte von Hüllen und Zellen sind identisch und die Behandlung der Hüllen mit EDTA hat eine geringgradige Temperaturerniedrigung zur Folge.

e) Ölsäure-Hüllen von E. coli K 1062

Die untenstehende Tabelle gibt die Ergebnisse der Phasenumwandlung der Hüllenpräparationen von E. coli K 1062, dem Ölsäure im Medium angeboten worden war, wieder.

E. coli K 1062/Ölsäure	T_t(°C)	ΔT(°C)	$\Delta I/I$
(1) Zellen	16	8	0.1
(2) Hüllen	19	13	0.1
(3) Hüllen mit EDTA behandelt 2 Std. bei 4 °C gerührt	21	16	0.2
(4) wie (3) zusätzlich Chloroform-Methanol Extraktion	keine Phasenumwandlung		

Tab. 13 Präparationen von E. coli K 1062 mit Ölsäure substituiert.
Optische Dichte bei 436 nm = 0.7; NPN-Konzentration: 1 µM. Messung mit zunehmender Temperatur.

Bedingt durch die Substitution der Fettsäure-Mutante mit Ölsäure, lag die Umwandlungstemperatur tiefer als im vorhergehenden Beispiel. Zusätzlich hatten die Zellen und Hüllen eine unterschiedliche Umwandlungstemperatur und -breite. Die Zugabe von EDTA zu den Hüllen hatte eine

weitere Erhöhung dieser beiden Parameter zur Folge.

Schließlich wurden dieselben Prozeduren noch mit E. coli K 12 Y mel, dem Wildtyp aus dem die Fettsäure-Mutante K 1062 isoliert worden war, durchgeführt. Die Umwandlungstemperaturen dieser Phasenumwandlungen sind denjenigen der vorhergehenden Beispiele in Tabelle 14 auf S. 50 nochmal gegenübergestellt.

Wie aus dieser Tabelle zu entnehmen ist, zeigte bei den nativen Bakterienzellen nur die mit einer Fettsäure substituierte auxotrophe Mutante K 1062 eine Phasenumwandlung in dem durch die Fettsäure vorgegebenen Bereich. Dagegen wiesen alle Hüllen eine, wenn auch in Intensität und Umwandlungstemperatur unterschiedliche Phasenumwandlung auf. Die Behandlung der Hüllen mit Lysozym, das die Mureinschicht abbaut, führte in allen Fällen zu einer Erhöhung der Umwandlungstemperatur, bei E. coli P 692-2d sogar zu einer sehr ausgeprägten. Der Intensitätsquotient $\Delta I/I$ änderte sich dadurch nicht. EDTA, der Komplexbildner mit zweiwertigen Kationen, bewirkte in allen Fällen, in denen die Umwandlungstemperatur oberhalb der des isolierten LPS (22 °C) lag, eine Temperaturerniedrigung um etwa 5 °C, bei den Ölsäurehüllen jedoch, bei denen die Umwandlungstemperatur unterhalb der des LPS lag, eine Temperaturerhöhung. Dies stimmt sinngemäß mit Messungen, die Overath et al. (31) an Membranfraktionen durchgeführt hat-

Präparationsstufe	Umwandlungstemperatur (°C) von E. coli				
	B/r	P692-2d	K1062/Ela	K1062/Öl	K12Ymel
Zellen	Ø	Ø	40	16	Ø
Hüllen	29	ca. 10	40	19	27
Hüllen mit Lysozym	30	36	n.g.	n.g.	30
Hüllen mit EDTA bei RT	25	31	37	n.g.	24
Hüllen mit EDTA bei 4 °C	26	n.g.	37	21	22
Hüllen nach Chloroform-Methanol Extraktion	Ø	n.g.	n.g.	Ø	n.g.

Tab. 14 Übersicht der Umwandlungstemperaturen der verschiedenen Präparationsstufen einiger Stämme von E. coli.

Abkürzungen: Ø = keine Phasenumwandlung; n.g. = nicht gemessen;
Ela = mit Elaidinsäure substituiert;
Öl = mit Ölsäure substituiert.

ten, überein. Sie fanden für die Cytoplasmamembran (L-Bande) von mit Elaidinsäure substituierten Zellen von E. coli K 1062 eine Umwandlungstemperatur von 34 °C und für die äußere Membran (H-Bande), in der sich das LPS befindet, eine solche von 30 °C, also eine Erniedrigung um 4°C. Dagegen wurde in mit Ölsäure substituierten Zellen des gleichen Stammes für die Cytoplasmamembran eine Umwandlungstemperatur von 9 °C gemessen, die sich für die äußere Membran um 7 °C auf 16 °C erhöhte. Beide Male verschob sich auch hier bei der äußeren Membran verglichen mit der Cytoplasmamembran die Umwandlungstemperatur in Richtung der des isolierten LPS.

Zusätzlich zu dem Einfluß auf die Umwandlungstemperatur bewirkte EDTA bei den Hüllenpräparationen, wie aus Tabelle 14 hervorgeht, einen Anstieg des Quotienten $\Delta I/I$, wobei es wie bei der Änderung der Umwandlungstemperatur keine Rolle spielte, ob die EDTA-Behandlung bei Raumtemperatur oder bei 4 °C durchgeführt wurde.

Wurden die Hüllenpräparationen mit einem Chloroform-Methanol Gemisch extrahiert, so war anschließend keine Phasenumwandlung mehr nachweisbar.

3. Elektrodialyse von Hüllen

Durch Elektrodialyse werden aus einer LPS-Suspension, wie bereits erwähnt, ein- und zweiwertige Kationen entfernt (26). Diese Behandlung führte bei isoliertem LPS zu einer Erhöhung des

Quotienten $\Delta I/I$ (vgl. S. 23). Eine ähnliche Wirkung hatte auch EDTA. Ausgehend von diesen Fakten wurden Hüllen ebenfalls elektrodialysiert und geprüft, ob sich dadurch eine ähnliche Veränderung wie nach der Einwirkung von EDTA ergeben würde.

Eine Suspension von Hüllen des Stammes E. coli B/r in 10 ml Wasser, welche bei 436 nm eine optische Dichte von 0.95 hatte, wurde mit einer Stromstärke von 6 Milliampère und einer Spannung von 300 Volt elektrodialysiert. Nach etwa 15 Minuten waren die Hüllen zur Anodenmembran gewandert und dort agglutiniert. Die Hüllen wurden danach von der Anodenmembran entfernt, in Wasser suspendiert und die Phasenumwandlung gemessen. Diese zeigte vor und nach der Elektrodialyse keinen Unterschied bezüglich der Umwandlungstemperatur, jedoch nahm der Quotient $\Delta I/I$ ab.

Eine Interpretation dieses Ergebnisses ist schwierig, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß durch die Agglutination an der Anodenmembran Veränderungen in der Zellwand vor sich gegangen sind.

III. Mischung von LPS und Phospholipid

Die Extraktion von Hüllenpräparationen, die eine Phasenumwandlung gezeigt hatten, mit Chloroform-Methanol, führt zu einem vollständigen Verlust der Umwandlung, wogegen eine derartige Extraktion bei isoliertem LPS keinen Einfluß auf dessen Phasenumwandlung hatte (21). Diese Beobachtungen ließen eine mögliche Wechselwirkung von LPS mit Phospholipid vermuten, die für die Phasenumwandlung in Hüllenpräparationen verantwortlich wäre.

Es wurde daher versucht LPS-Phospholipid Mischungen in vitro herzustellen, um mögliche Wechselwirkungen durch die Messung der Phasenumwandlung beurteilen zu können.

1. Mischung nach der Methode von Rothfield

Rothfield (27) hat eine Methode angegeben, nach der man aus LPS und Phosphatidyläthanolamin in Wasser in Gegenwart von EDTA einheitliche Vesikel erhält (vgl. Methoden S. 11). Als Test dafür, daß tatsächlich solche Vesikel erhalten wurden, benützte er ein Enzymsystem der äußeren Membran, das nur dann Substrat umsetzt, wenn es einen ternären Komplex, bestehend aus Enzym, LPS und Phospholipid, bildet (40). Analytische Untersuchungen des Komplexes zeigten eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem der äußeren Membran.

Entsprechend dieser Methode wurden ver-

schiedene Mischungsverhältnisse von LPS mit Phospholipid angesetzt um zu sehen, ob ein steigender LPS-Anteil irgendeinen Einfluß auf die Phasenumwandlungen beider Komponenten hätte und ob eine einzige Phasenumwandlung durch diese Mischung resultieren würde.

Der Phospholipidextrakt aus E. coli B/r zeigte eine Phasenumwandlung, die bei etwa 6 °C endet und deren Umwandlungstemperatur für eine Messung mit der verwendeten Apparatur zu tief lag. Ähnliches gilt für das Phosphatidyläthanolamin, dessen Umwandlungskurve bei 8 °C endet.

Bei einem molaren Verhältnis von LPS und Phospholipid von 1:5 wurden einmal zwei getrennte Phasenumwandlungen für LPS und Phospholipid gemessen, die sich kaum von denen für die isolierten Komponenten unterschieden. Alle übrigen molaren Mischungsverhältnisse von LPS und Phospholipid (1:10 und 1:30) zeigten nur die Phasenumwandlung des Phospholipids, die genau mit der des isolierten Phospholipids übereinstimmte.

Die molaren Mischungsverhältnisse von LPS und Phosphatidyläthanolamin (1:5, 1:10, 1:30) zeigten ebenfalls nur eine Phasenumwandlung, die mit der des isolierten Phosphatidyläthanolamins identisch war.

Auch die Mischung des Lipidextrakts aus E. coli K 1062, das mit Ölsäure substituiert worden war und eine Umwandlungstemperatur von 17 °C zeigte, mit LPS nach der Vorschrift von Rothfield, zeigte bei einem molaren Verhältnis

von LPS und Phospholipid von 1:5 und 1:10 nur die Phasenumwandlung des Phospholipids.

Aus diesen Ergebnissen kann wohl nur der Schluß gezogen werden, daß mit dieser Methode eine Mischung der beiden Komponenten nicht erreicht werden konnte.

2. Mischung in Phenol/Chloroform/Petroleumbenzin

Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde von dem Gedanken ausgegangen, daß eine Mischung von Phospholipid und LPS wohl am besten dann zu erreichen wäre, wenn beide Komponenten gelöst wären und dann gemeinsam ausgfällt würden.

In dem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Petroleumbenzin (2:5:8 v/v/v) waren sowohl das LPS als auch das Phospholipid in einem molaren Verhältnis von 1:5 löslich. Chloroform und Petroleumbenzin wurden am Rotationsverdampfer abgezogen. Das zurückgebliebene Phenol wurde mit Äther extrahiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die Phasenumwandlung gemessen. Die nach dieser Prozedur erhaltene Suspension ergab eine Phasenumwandlung, die genau mit der des isolierten LPS identisch war.

Wegen der schlechten Meßbarkeit der Phasenumwandlung von Phosphatidyläthanolamin, das aus E. coli B/r isoliert worden war, mit einer unter 0 ^{o}C beginnenden Umwandlung, wurde zusätzlich das synthetisch hergestellte Dimyristoylphosphatidyläthanolamin (DMPE) verwendet, das wegen der kürzeren gesättigten Fettsäureketten eine Um-

wandlungstemperatur von 48 °C und eine Umwandlungsbreite von nur 1 °C hat. Diese hohe Umwandlungstemperatur war auch deshalb günstig, da sie sich gut von der des LPS unterschied und ein möglicher gegenseitiger Einfluß dadurch leichter feststellbar wäre.

Die Messung des Rückstandes nach Entfernung des Lösungsmittelgemisches mit einem molaren Verhältnis von LPS zu DMPE von 1:5 und 1:8 ergab jedesmal zwei Phasenumwandlungen, die sich von denen der reinen Komponenten kaum unterschieden. Auch aus diesen Versuchen ist nur der Schluß zu ziehen, daß eine Mischung von Lipid und LPS auf diese Weise nicht gelungen war.

3. Mischung durch Ultraschall-Behandlung

Es ist bekannt, daß LPS und auch Phospholipid durch Ultraschallbehandlung kleinere Vesikel bilden (16). Diese kleineren Vesikel begünstigen eine Fusion, da mit steigender Krümmung der Vesikeln deren Energiegehalt und damit die Tendenz zur Verschmelzung mit anderen Vesikeln zunimmt.

Die Behandlung von LPS und Dimyristoyl-L-α-lecithin, einem weiteren synthetischen Phospholipid mit einer Umwandlungstemperatur von 41 °C und einer Umwandlungsbreite von 2 °C in einem molaren Verhältnis von jeweils 1:1 und 1:5 mit Ultraschall, ergab wiederum zwei Phasenumwand-

lungen. Dabei wurde die des LPS um so kleiner, je länger die Beschallzeit war, wie bereits Messungen an isoliertem LPS gezeigt hatten (vgl. S. 33). Auch die Behandlung von LPS und Phospholipid mit Ultraschall brachte also keine Mischung zustande.

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse nur festgestellt werden, daß es keinesfalls in einfacher Weise gelingt, eine Doppelschicht in vitro herzustellen, in welcher LPS und Phospholipid als Mischphase vorliegen.

IV. Zugabe von Phospholipid und LPS zu Hüllen

Da die Versuche der Mischung von LPS und Phospholipid in vitro erfolglos verlaufen waren, wurde nun versucht, LPS und Phospholipid unter geeigneten Bedingungen zu Hüllen zu geben, um nach Einbau mögliche Wechselwirkungen studieren zu können.

Die Versuchsbedingungen basierten teilweise auf einer Arbeit von Devor et al. (34), in der eine Methode angegeben wurde, durch die eine Hybridisierung (Fusion) von zwei Cytoplasmamembranen verschiedener Bakterienstämme erreicht wurde. Die Hybridisierung wurde durch Abschirmung der negativen Ladungen mit Kationen, wie Spermin und Magnesiumionen und Zentrifugation mit hoher Drehzahl bei 37 °C erreicht.

Als Acceptor für den Einbau von Phospholipid bzw. LPS dienten Hüllen, deren LPS nur noch KDO und keine Heptose- und Zuckermoleküle mehr hatte (vgl. Abb. 2). Solche Mutanten haben, wie für S. typhimurium gezeigt werden konnte (37), vermehrt Phospholipid in der äußeren Membran. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das gleiche auch für E. coli gilt (38). Durch den Wegfall der Heptose- und Zuckermoleküle des LPS werden derartige Mutanten empfindlich gegenüber Detergentien, weil diese, wie z.B. Dodecylsulfat, zumindest in die äußere Membran eindringen können. Solche Mutanten können daher im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen auf einem Nährmedium, dem eine

bestimmte Detergenzmenge zugesetzt wurde, nicht wachsen. Diese strukturellen Besonderheiten der Mutante bildeten zusammen mit den aufgeführten methodischen Bedingungen die Voraussetzungen für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen.

1. Zugabe von Phospholipid zu Hüllen

Die Mutante E. coli K 12 K 2754, die freundlicherweise von Dr. Jann zur Verfügung gestellt worden war, hat nur noch ein KDO-Molekül am Lipid A des LPS und ist deshalb sehr empfindlich gegen Detergentien. Der Wildtyp E. coli K12 K 2464 hat dagegen eine normale LPS-Zusammensetzung und ist infolgedessen unempfindlich gegen Detergentien.

Hüllen dieser beiden Stämme wurden nach der Methode von Braun et al. (32) präpariert. Dimyristoylphosphatidyläthanolamin (DMPE) wurde vorher eine Viertelstunde mit Ultraschall behandelt um möglichst kleine Vesikel zu erhalten. Hüllen mit einem Trockengewicht von 0.5 mg und 0.5 mg DMPE wurden eine Stunde bei 45 ^{o}C inkubiert, langsam abgekühlt und einige Male mit Wasser gewaschen (Details s. Methoden S. 15).

a) Hüllen des Wildtyps E. coli K 12 K 2464

Die verschiedenen Probenansätze sind in Abbildung 14 wiedergegeben und die entsprechenden Phasenumwandlungen mit den Buchstaben a-f gekennzeichnet. Diese Buchstaben werden auch im Text verwendet.

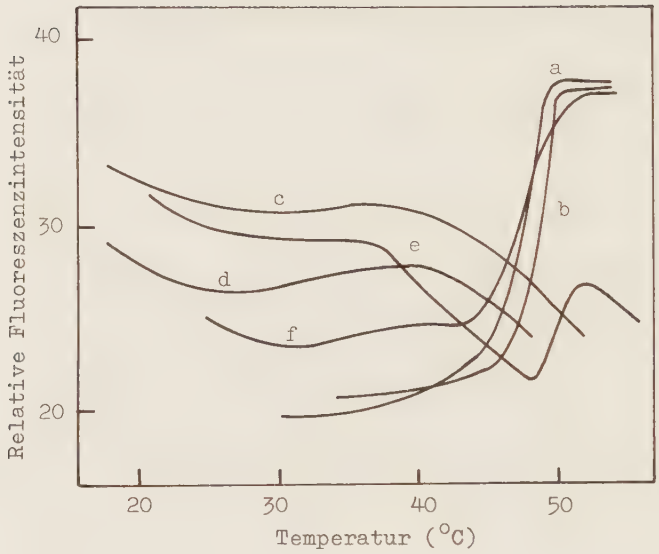


Abb. 14 Fluoreszenzänderung der Hüllen von K 2464 (E. coli K 12 Wildtyp) und Dimyristoylphosphatidyläthanolamin.

(a) Dimyristoylphosphatidyläthanolamin (DMPE, 370 µM) in 10 mM Kaliummaleatpuffer pH 6.6;

(b) wie (a) jedoch mit 20 mM $MgCl_2$;

(c) 500 µg Hüllen in 3 ml Puffer;

(d) wie (c) jedoch mit 20 mM $MgCl_2$;

(e) 500 µg Hüllen + DMPE (s. Methoden)

(f) wie (e) jedoch mit 20 mM $MgCl_2$.

Die Phasenumwandlung wurde mit einer NPN-Konzentration von 1 µM bei zunehmender Temperatur gemessen.

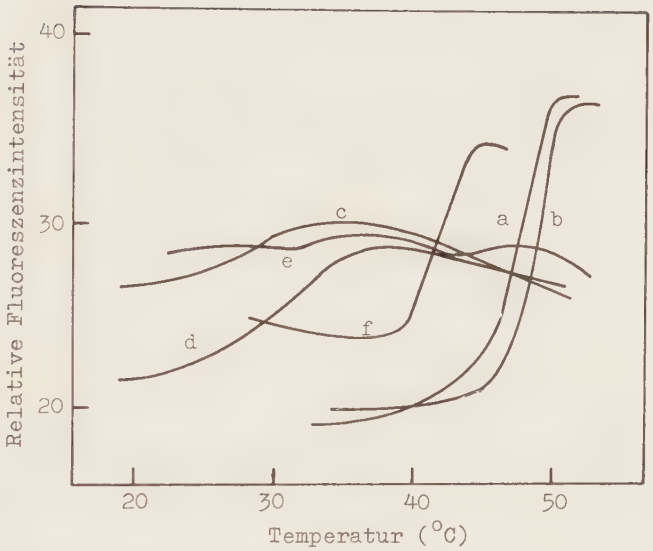


Abb. 15 Fluoreszenzänderung von Hüllen der LPS-Mutante K 2754 und Dimyristoylphosphatidyläthanolamin.

Es wurden dieselben Ansätze (a-f) wie in Abbildung 14 beschrieben unter denselben Bedingungen gemessen.

Die Zugabe von Magnesiumchlorid zu DMPE (b) brachte nur eine Erhöhung der Umwandlungstemperatur um 1 °C auf 48 °C und eine geringe Vergrößerung des Intensitätsquotienten $\Delta I/I$ mit sich. Die Phasenumwandlung der Hüllen änderte sich ohne (c) und mit (d) Magnesiumchlorid nicht (T_t ca. 33 °C). Nach Zugabe von DMPE zu den Hüllen waren zwei getrennte Phasenumwandlungen mit Umwandlungstemperaturen von etwa 33 °C und 48 °C vorhanden (e und f). In Gegenwart von Magnesiumchlorid (f) wurde die Phasenumwandlung von DMPE gegenüber derjenigen der Hüllen dominanter. Die beiden getrennten Phasenumwandlungen zeigten eindeutig, daß ein Einbau des Phospholipids in die Hüllen von E. coli K 2464 nicht stattgefunden hatte.

b) Hüllen der Mutante E. coli K 2754

Mit der detergenzempfindlichen Mutante K 2754 wurden dieselben Ansätze gemacht wie mit dem Wildtyp. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 wiedergegeben.

Die Phasenumwandlungen a-f entsprechen denen in Abbildung 14. Zugabe von DMPE ohne Magnesiumchlorid (e) zu den Hüllen führte zu zwei Phasenumwandlungen mit Umwandlungstemperaturen von ca. 35 °C und 47 °C, während in Anwesenheit von Magnesiumchlorid (f) nur noch eine einzige Phasenumwandlung mit einer Umwandlungstemperatur von 42 °C auftrat. Das bedeutet eine Verschiebung um 5 °C zu tieferen

Temperaturen verglichen mit der des isolierten DMPE. Bezüglich der Breite der Phasenumwandlung ergab sich verglichen mit dem DMPE ein Anstieg auf das dreifache. Diese beiden Tatsachen sprechen dafür, daß das DMPE in Anwesenheit von Magnesiumionen in die äußere Membran der KDO-Mutante K 2754 eingebaut worden ist und im Gegensatz zu allen vorhergehenden Versuchen hier in der Tat eine Mischphase entstanden war.

2. Zugabe von LPS zu Hüllen

Unter analogen Versuchsbedingungen wurde LPS zu Hüllen von E. coli K 12 K 2464 und deren KDO-Mutante K 2754 gegeben um eventuell auch den Einbau von LPS in die Hüllen zu erreichen, der durch die Messung der Phasenumwandlung hätte verfolgt werden können.

Das LPS wurde eine Minute bei 30 Watt beschallt, um möglichst kleine Bruchstücke der Doppelmembran zu erhalten, die sich vielleicht besser einbauen ließen. Zu 1 mg LPS wurden 0.5 mg getrocknete Hüllen gegeben, bei 45 °C eine Stunde inkubiert und anschließend mehrmals gewaschen. Durch das vorhergehende Beschallen war die Phasenumwandlung des isolierten LPS nur noch schwach ausgeprägt. Der Ansatz der Hüllen in Gegenwart von LPS mit oder ohne Magnesiumchlorid zeigte nur die breite Phasenumwandlung der Hüllen, die sich gegenüber der Phasenumwandlung der Hüllen alleine nicht verändert hatte. Dieses Ergebnis gilt sowohl für den Wildtyp K 2464 als auch für

die detergenzempfindliche Mutante K 2754. Es kann deshalb nur der Schluß gezogen werden, daß LPS im Gegensatz zum DMPE nicht in die Hüllen der Mutante K 2754 eingebaut worden ist.

D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, mit Hilfe eines bisher unbekannten Verhaltens des isolierten Lipopolysaccharids Aussagen über den Zustand dieses Endotoxins in der Zellwand von Escherichia coli zu erhalten.

Die Untersuchungen mit der isolierten Substanz sollen im Folgenden zuerst diskutiert werden; sie brachten zum größten Teil klare und gut interpretierbare experimentelle Antworten. Die dann zu behandelnden Studien bezüglich des Lipopolysaccharids in der Zellwand ergaben Resultate, die zeigen, daß die Situation derart komplex ist, daß eindeutige Aussagen über das Verhalten des Endotoxins in der äußeren Membran mit dieser Methode vorläufig nicht möglich sind.

1. Isoliertes Lipopolysaccharid

Isoliertes Lipopolysaccharid (LPS) bildet in wässriger Suspension bandartige Doppelschichten (vgl. Abb. 3). Die LPS-Moleküle zeigen ähnlich wie Lipidmoleküle eine temperaturabhängige Umwandlung von einem "kristallinen", geordneten Zustand in einen "flüssigen", ungeordneten. Diese Phasenumwandlung kann mittels Fluorimetrie und Röntgenstrahlbeugung verfolgt werden (21). Mit beiden Methoden erhält man übereinstimmend eine Umwandlungstemperatur von 21 $\pm$ 1 °C und eine Umwandlungsbreite ΔT von 10 $\pm$ 1 °C (s. Seite 6).

Auf die Phasenumwandlung des isolierten LPS haben verschiedene Faktoren einen Einfluß.

Der Einfluß des pH-Wertes und monovalenter Kationen auf die Phasenumwandlung des LPS ist dem auf die Umwandlung von Phospholipiden sehr ähnlich (19,20). Eine Erhöhung des pH-Wertes durch Zugabe von Natronlauge führt zu einer Erniedrigung der Umwandlungstemperatur T_t des LPS beginnend bei einem pH-Wert von 8, wohingegen eine pH-Erniedrigung kaum einen Einfluß auf T_t hat. Der Temperaturabfall im alkalischen Bereich fällt zusammen mit einem schwachen Knick der Titrationskurve bei pH 8.5.

Träuble und Eibl (19) fanden für die beiden Phospholipide Dimyristoyl-sn-glycerin-3-phosphoryläthanolamin und Dimyristoyl-sn-glycerin-3-phosphat ebenfalls einen, wenn auch stärker ausgeprägten Temperaturabfall im alkalischen Bereich und einen schwachen Anstieg bei saurem pH. Sie erklären diesen Effekt mit einer Erhöhung der Oberflächenladung der Doppelschicht bei alkalischem pH-Wert. Auf diese Weise könnte auch die Abnahme von T_t bei LPS bei alkalischen pH-Werten erklärt werden, da es zu einer Freisetzung von Protonen kommt, was zu einer Erhöhung der Oberflächenladung und damit zu einer Senkung von T_t führt. Die relative Intensitätsänderung $\Delta I/I_t$ ist im neutralen Bereich am größten und nimmt sowohl zur sauren als auch zur alkalischen Seite hin ab. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Phasenumwandlung im neutralen Bereich optimal ist, während sie im sauren und alkalischen Bereich

irgendwie gestört ist. Die Breite der Phasenumwandlung ΔT des LPS ändert sich im Gegensatz zu der von Dimyristoyl-sn-glycerin-3-phosphat (19) nicht.

Natriumchlorid senkt mit steigender Konzentration die Umwandlungstemperatur des LPS, wobei die Temperaturerniedrigung bei niedrigen Salzkonzentrationen steiler verläuft als bei höheren. Insgesamt beträgt sie etwa 5 °C bei einer Ionenkonzentration von 0.5 M NaCl. Dies stimmt überein mit Messungen von Träuble und Eibl (19) bezüglich der Phospholipide. Diese Autoren führen die Erniedrigung der Umwandlungstemperatur in Gegenwart von Natriumchlorid auf eine Erhöhung der Oberflächenladung der Doppelschicht zurück, die durch Natriumionen über eine Dissoziierung z.B. der Phosphatgruppen der Phospholipidmoleküle hervorgerufen wird. Ähnliche Mechanismen könnten auch die Erniedrigung der Umwandlungstemperatur des LPS erklären, zumal beobachtet wurde, daß die Zugabe von Natriumchlorid zu LPS den pH-Wert senkt, also zu einer Abspaltung von Protonen führt.

Überraschend und im Gegensatz zu den einwertigen Kationen haben zweiwertige bei LPS keinen Einfluß auf T_t. Dies ist ganz unterschiedlich zu den Ergebnissen für die Phospholipide, bei denen Magnesiumionen zu einer Erhöhung der Umwandlungstemperatur führen (19,20). Während Träuble und Eibl (19) denselben Effekt auch für Calciumionen finden, führen diese bei Untersuchungen von Jacobson und Papahadjopoulos (20)

zum Verschwinden der Phasenumwandlung der Phospholipide. Theoretisch würde man auch für das LPS durch die Bindung von zweiwertigen Kationen an negative Gruppen, wie z.B. Phosphatgruppen, eine Erniedrigung von T_t durch die Herabsetzung der Oberflächenladung der Doppelschichten erwarten. Stattdessen findet man nur eine drastische Abnahme von $\Delta I/I$ der Phasenumwandlung in Gegenwart von Mg^{++} und Ca^{++}, wobei der Einfluß von Ca^{++} mit den Ergebnissen von Jacobson und Papahadjopoulos (20) übereinstimmt. Die Ursache für das allmähliche Verschwinden der Phasenumwandlung von LPS mit steigender Konzentration zweiwertiger Kationen ist unbekannt, aber es ist gut möglich, daß dafür die Phosphatgruppen des Kohlenhydratanteils des LPS verantwortlich sind. Man könnte daran denken, daß die zweiwertigen Kationen durch die Bindung an die Phosphatgruppen von nebeneinanderliegenden Kohlenhydratketten des LPS die Oberfläche der Doppelschichten so starr machen, daß Übergänge von einem flüssigen, ungeordneten in einen geordneten Zustand nicht mehr möglich sind.

Die Elektrodialyse von LPS hat bezüglich der Phasenumwandlung genau die entgegengesetzte Wirkung wie die zweiwertigen Kationen. Das elektrodialysierte LPS zeigt im Vergleich zum Ausgangsmaterial eine Vergrößerung des Quotienten $\Delta I/I$. Dieses Ergebnis läßt sich gut mit der Feststellung von Galanos und Lüderitz (26) erklären, daß durch die Elektrodialyse Magnesiumionen vom LPS entfernt werden. In guter Übereinstimmung mit

diesen Autoren ergab die quantitative Analyse kaum einen Unterschied bezüglich des Glucosamin-, Glycin- und KDO-Gehaltes von LPS vor und nach der Elektrodialyse.

Eine weitere Methode, die Phasenumwandlung des LPS zum Verschwinden zu bringen, stellt die Behandlung einer LPS-Suspension in Wasser mit Ultraschall dar. Dabei nimmt der Intensitätsquotient $\Delta I/I$ in Abhängigkeit von der Beschallzeit nahezu exponentiell ab. Einen ähnlichen Effekt fanden Jacobson und Papahadjopoulos (20) nach Beschallung von Phospholipiden. Es ist seit längerem bekannt, daß die Ultraschallbehandlung von LPS zu morphologischen Änderungen der Doppelschicht führt, wobei aus der Anordnung in Form langer Streifen (vgl. Abb. 3) kleine Kugeln oder Scheibchen entstehen. Diese morphologische Veränderung führt wohl zu einer Verminderung der Kooperativität der Fettsäureketten verbunden mit einer Abnahme von $\Delta I/I$.

Die Phasenumwandlung von LPS kann außer durch Fluorimetrie und Röntgenstrahlbeugung (21) zusätzlich noch mit Lichtstreuung verfolgt werden. Ein Vergleich mit den fluorimetrisch ermittelten Daten zeigt eine gute Übereinstimmung bezüglich Umwandlungstemperatur und Umwandlungsbreite. Die relative Intensitätsänderung $\Delta I/I$ ist bei Lichtstreuung größer. Die Lichtstreuung hat als direkte Methode zudem noch den Vorteil, daß kein Indikator eingeführt werden muß, der eventuell eine Störung der Phasenumwandlung zur Folge haben könnte.

2. Lipopolysaccharid in der äußeren Membran

Hüllen und die äußere Membran (H-Bande) von Bakterien zeigen eine Phasenumwandlung über deren Herkunft nur Vermutungen angestellt werden können. Klar ist jedoch, daß die beobachteten Umwandlungen der Kohlenwasserstoffketten vom geordneten in den ungeordneten Zustand nicht durch das Verhalten des LPS oder gar des Phospholipids allein erklärt werden können, sondern auf einer Wechselwirkung beider Komponenten oder zusätzlich auch noch auf der Mitwirkung des in der Membran vorhandenen Proteins beruhen.

Zellhüllen, die aus äußerer Membran, einer Mureinschicht und Bruchstücken der Cytoplasmamembran bestehen, zeigten Phasenumwandlungen mit Umwandlungstemperaturen in einem Bereich von 25-30 °C. Diese lagen höher als diejenigen von LPS mit 22 °C und Phospholipid mit weniger als 6 °C. Theoretisch wäre zu erwarten, daß eine Mischung von LPS und Phospholipid, wie sie in den Hüllen vorliegt, eine Umwandlungstemperatur zeigt, die zwischen denen der einzelnen Komponenten liegt. Ein derartiges Ergebnis wurde tatsächlich mit Hüllen der detergenzempfindlichen LPS-Mutante E. coli K 2754 erhalten. Die Hüllen zeigten eine Umwandlungstemperatur von etwa 32 °C, die sich nur um 1 °C von jener der Hüllen des Wildtyps E. coli K 2464, der das vollständige LPS in der äußeren Membran besitzt, unterschied. Die Zugabe von Dimyristoylphosphatidyläthanolamin (DMPE), einem Phospholipid mit

einer Umwandlungstemperatur von 47 °C, zu den Hüllen des Wildtyps ergab zwei getrennte Phasenumwandlungen, die denjenigen der isolierten Komponenten entsprachen, wogegen die Mischung von Hüllen der Mutante E. coli K 2754 mit DMPE unter den gleichen Bedingungen nur noch eine einzige Phasenumwandlung zur Folge hatte, deren Umwandlungstemperatur von 42 °C zwischen derjenigen der Hüllen vor Einbau (32 °C) und des DMPE (47 °C) lag (vgl. Abb. 14 und 15).

Aus diesem Ergebnis darf wohl der Schluß gezogen werden, daß das DMPE in die Hüllen der Mutante eingebaut wurde und dort mit den vorhandenen Phospholipid- und LPS-Molekülen Wechselwirkungen eingegangen ist, die zu einer Änderung der Phasenumwandlung führten. Ein derartiger Einbau hat beim Wildtyp offensichtlich nicht stattgefunden.

Dieser Einbau von Phospholipid in die Hüllen der LPS-Mutante eröffnet vielleicht die Möglichkeit, mehr über die Anordnung und Wechselwirkung der einzelnen Komponenten der Bakterienmembran zu erfahren. Nach Beendigung der oben beschriebenen Experimente berichteten Jones und Osborn (41,42) über die Möglichkeit Phospholipid in lebende Bakterien der Species S. typhimurium einzubauen. Es sollte daher jetzt möglich sein die Auswirkungen verschiedener Phospholipide auf die vielfältigen Funktionen der Zellwand sogar an lebendigen Bakterien zu untersuchen.

Der Einbau von LPS in Hüllen mit dem Ziel einen möglichen Einfluß von LPS auf die Phasenumwandlung der Membran studieren zu können, gelang mit der angegebenen, dem Einbau von DMPE analogen Methode, nicht. Dies hängt sicherlich mit der Molekülgröße und möglicherweise mit der geringeren Affinität des LPS gegenüber Lipidmolekülen zusammen.

Für eine Wechselwirkung von LPS und Phospholipid in der äußeren Membran sprechen auch die Phasenumwandlungen, die für die Membranfraktionen verschiedener Bakterienstämme gemessen wurden.

Die Umwandlungstemperaturen der äußeren Membran (H-Bande) verschiedener Bakterienstämme von E. coli liegen in einem Temperaturbereich von 21-38 °C, wogegen sich diejenigen der Cytoplasmamembranen zwischen 3 und 8 °C bewegen. Diese Temperaturunterschiede sind begründet in der unterschiedlichen Zusammensetzung der beiden Membranen. Die Cytoplasmamembran enthält weniger Protein und als Lipidkomponente nur Phospholipid, weshalb hier Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lipidmolekülen eine größere Rolle spielen sollten als in der äußeren Membran, die neben einem hohen Proteinanteil von etwa 50% zusätzlich zu einem Phospholipidgehalt von 15-20% noch circa 30% LPS besitzt (7). Zudem ist die Phospholipidzusammensetzung in beiden Membranen noch etwas verschieden, wobei jedoch Phosphatidyläthanolamin jeweils den Hauptanteil ausmacht.

Die aus der Bakterienzellwand extrahierten Phospholipide zeigten eine Phasenumwandlung, die bei 6 °C endet, wodurch die niedrigen Umwandlungstemperaturen der Cytoplasmamembran ihre Erklärung finden. Die höheren Umwandlungstemperaturen der äußeren Membran sind sehr wahrscheinlich auch auf den Einfluß des LPS, das als isolierte Substanz eine Umwandlungstemperatur von 22 °C hat, zurückzuführen. Das LPS alleine erklärt jedoch nicht die sehr hohen Umwandlungstemperaturen der äußeren Membran von E. coli P 400 und der Mutante P 692-2d, deren Umwandlungstemperatur noch um 5 °C höher liegt, obwohl sie weniger Protein und mehr Phospholipid enthält, was eine niedrigere Temperatur erwarten ließe. Möglicherweise könnte die Wechselwirkung zwischen LPS und Phospholipid jedoch zu einer kompakteren Anordnung der Kohlenwasserstoffketten beider Komponenten führen, was eine Erhöhung der Umwandlungstemperatur zur Folge haben könnte. Zusätzlich ist, wie schon erwähnt, an eine Beteiligung der Proteine an der Phasenumwandlung zu denken.

Einen Hinweis auf die Beteiligung von LPS an der Phasenumwandlung der äußeren Membran gibt auch die Arbeit von Overath et al. (31), in der Meßwerte für die Phasenumwandlungen der L- und H-Bande der mit Elaidin- bzw. Ölsäure substituierten fettsäureauxotrophen Mutante E.coli K1062 angegeben werden. Die Cytoplasmamembran (L-Bande) der mit Elaidinsäure substituierten Mutante hat

eine Umwandlungstemperatur von 34 °C, während die äußere Membran (H-Bande) eine solche von 30 °C aufweist. Diese Erniedrigung könnte durch den Einfluß von LPS erklärt werden, das die Umwandlungstemperatur der äußeren Membran in Richtung der des isolierten LPS (22 °C) verschiebt. Ebenso könnte man im Fall der mit Ölsäure substituierten Bakterien argumentieren, deren Cytoplasmamembran eine Umwandlungstemperatur von etwa 9 °C und deren äußere Membran eine von 16 °C hat. Auch hier könnte durch den Einfluß des LPS die Umwandlungstemperatur der äußeren Membran in Richtung der des isolierten LPS verschoben worden sein.

Die schrittweise Weiterbehandlung von Hüllen mit Substanzen, die bei Zellen nach einer Vorschrift von Osborn (33) zur Trennung der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran führen, sollte weiteren Aufschluß über die Wechselwirkung zwischen LPS und Phospholipid, sowie den Einfluß von Lysozym und EDTA auf diese bringen.

Da sich nach Zugabe von Lysozym die Umwandlungstemperatur der Hüllen kaum und die Intensität der Phasenumwandlung nicht änderte, hat man aufgrund dieser Messungen den Eindruck, daß sich durch den Abbau des Mureins an der Struktur der äußeren Membran nichts ändert. Genaue Aussagen lassen sich jedoch mit dieser Methode nicht machen. EDTA bewirkt in allen Fällen eine Verschiebung der Umwandlungstemperatur der Hüllen in Richtung der des isolierten LPS und einen

Anstieg des Quotienten $\Delta I/I$. Durch die Wegnahme der zweiwertigen Kationen könnte die Wechselwirkung der LPS-Moleküle mit den Lipidmolekülen im Membranverband entweder qualitativ oder/und quantitativ verstärkt werden, was sowohl die Änderung der Umwandlungstemperatur in Richtung der des isolierten LPS, als auch die Vergrößerung von $\Delta I/I$ erklären würde. Ob durch die EDTA-Behandlung Änderungen der Anordnungen der einzelnen Komponenten der äußeren Membran hervorgerufen werden, läßt sich mit dieser Methode jedoch nicht ermitteln.

Nach Elektrodialyse zeigen die Hüllen keine Veränderung der Phasenumwandlung, was man vielleicht hätte erwarten können, da durch diese Methode beim isolierten LPS Magnesiumionen entfernt werden, was der Einwirkung von EDTA entspricht. Bei der Beurteilung dieses Ergebnisses ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Hüllen an der Anodenmembran agglutinert waren und nicht abzusehen ist, welche Veränderungen sich hierbei abgespielt haben mögen.

Wurden Hüllen, die eine Phasenumwandlung gezeigt hatten, mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert und damit das Phospholipid herausgelöst, so war anschließend keine Phasenumwandlung mehr nachweisbar. Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß die Phospholipide für die Phasenumwandlung der Hüllen unbedingt notwendig sind.

Der direkte und schlüssige Beweis für die Wechselwirkung zwischen LPS und Phospholipid, nämlich die Mischung von LPS und Phospholipid in vitro konnte nicht erbracht werden. Es wurden mehrere Methoden angewandt, um eine Mischung der beiden Komponenten zu erhalten, was aber offensichtlich nicht gelang. Entweder wurden zwei getrennte Phasenumwandlungen erhalten oder es war nur jeweils die einer Komponente zu sehen, die sich gegenüber der der reinen Komponente nicht verändert hatte. Bei einer wirklichen Mischung hätte sich aber eine einzige Phasenumwandlung ergeben müssen, deren Umwandlungstemperatur zwischen denen der einzelnen Komponenten gelägen wäre. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Arbeit von Rothfield (27), in der er eine Methode angibt, mit der man eine Mischung von LPS und Phospholipid in vitro erhalten soll, die der in vivo sehr nahekommt.

Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse können eindeutige Aussagen über das Verhalten von LPS und dessen Anordnung in der äußeren Membran nicht gemacht werden. Es konnten jedoch stichhaltige Hinweise für eine Mitwirkung von LPS bei der Phasenumwandlung erbracht werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem bisher unbekannten physikalisch-chemischen Verhalten von Lipopolysaccharid (LPS), einem Endotoxin, das in der Zellwand von Gram-negativen Bakterien vorkommt und für deren serologische Spezifität verantwortlich ist.

Es wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Phasenumwandlung des isolierten LPS und die Wechselwirkung von LPS mit Phospholipid in vitro und in der Bakterienmembran bezüglich der Phasenumwandlung untersucht.

Wurde mit dem aus E. coli B/r isolierten LPS zur weiteren Reinigung eine Elektrodialyse ausgeführt, so änderte sich die Umwandlungstemperatur T_t nicht, wogegen die Breite der Umwandlung ΔT leicht und die relative Fluoreszenzintensität $\Delta I/I$ fast auf das Dreifache des Ausgangswertes anstieg. Die Analyse des Glycin-, Glucosamin- und KDO-Gehaltes ergab nahezu identische Werte für das LPS vor und nach der Elektrodialyse.

Die Erhöhung des pH-Wertes der LPS-Suspension hatte einen deutlichen, etwa bei pH 8 beginnenden Abfall von T_t zur Folge. In diesem pH-Bereich zeigte die Titrationskurve des LPS einen schwachen Knick. Die Erniedrigung des pH-Wertes bewirkte dagegen nur einen leichten Anstieg von T_t.

Zugabe von Natriumchlorid zu einer LPS-

Suspension führte zu einer kontinuierlichen Erniedrigung von T_t, die im Bereich niedriger Salzkonzentrationen steiler verlief als bei höheren Konzentrationen und bei 0.5 M Natriumchlorid etwa 5 °C ausmachte. Die Temperaturerniedrigung war bei pH 8 im Anfangsteil etwas ausgeprägter als bei pH 7.

Zweiwertige Kationen hatten im Gegensatz zu den einwertigen keinen Einfluß auf die Umwandlungstemperatur des LPS. Magnesium- und Calciumionen führten jedoch zu einer deutlichen Verkleinerung der Intensitätsänderung ΔI oder mit anderen Worten zu einem allmählichen Verschwinden der Phasenumwandlung. Derselbe Effekt wurde durch Behandlung mit Ultraschall erreicht.

Neben der Messung der Phasenumwandlung des LPS mit Fluorimetrie und Röntgenstrahlbeugung konnte diese auch durch die Intensitätsänderung der Lichtstreuung verfolgt werden. Ein Vergleich mit den fluorimetrisch ermittelten Daten ergab eine gute Übereinstimmung von T_t und ΔT. Die relative Intensitätsänderung $\Delta I/I$ war bei Lichtstreuung jedoch größer. Diese hatte zudem den Vorteil, daß in die Probe kein Indikator eingeführt werden mußte.

Bakterienhüllen und Präparationen der äußeren Membran der Zellwand von Gram-negativen Bakterien zeigten, mit N-Phenyl-1-naphthylamin als Indikator fluorimetrisch gemessen, Phasenumwandlungen mit Umwandlungstemperaturen von 25-29 °C bzw. 21-33 °C. Diese Umwandlungen be-

ruhen möglicherweise auf einer Wechselwirkung von Phospholipid und LPS, wobei zusätzlich eine Beteiligung der Membranproteine in Betracht kommen könnte.

Wurde Dimyristoylphosphatidyläthanolamin, ein Phospholipid mit einer Umwandlungstemperatur von 48 °C, mit Hüllen einer detergenzemfindlichen LPS-Mutante von E. coli K 12, die eine Umwandlungstemperatur von 33 °C hatten, inkubiert, so resultierte nur noch eine Phasenumwandlung mit einer Umwandlungstemperatur von 42 °C. Das Auftreten dieser neuen Phasenumwandlung, deren T_t zwischen denen der beiden eingesetzten Komponenten lag, legt den Schluß nahe, daß das Phospholipid in die äußere Membran der Mutante eingebaut wurde und dort mit den übrigen Membranbestandteilen Wechselwirkungen einging.

Weitere Versuche, unter ähnlichen Bedingungen LPS in Hüllen der Mutante einzubauen, verliefen erfolglos. In die äußere Membran des Wildtyps wurden weder Phospholipid noch LPS eingebaut.

Der direkte Beweis, daß die Phasenumwandlungen der Zellwand auf einer Wechselwirkung von Phospholipid und LPS beruhen, konnte nicht erbracht werden, da Untersuchungen von Modellsystemen in vitro nicht erfolgreich waren:

Phospholipid-LPS Präparationen, die nach verschiedenen Methoden hergestellt worden waren, zeigten entweder nur die unveränderte Umwandlung einer Komponente oder zwei getrennte Phasenumwandlungen von LPS und Phospholipid.

F. ABKÜRZUNGEN

Neben den gebräuchlichen chemischen Symbolen und Abkürzungen von Maßeinheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

DMPE	Dimyristoylphosphatidyläthanolamin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
I	Intensität
ΔI	Änderung der Intensität während der Phasenumwandlung
ΔI/I	relative Intensitätsänderung
KDO	2-Keto-3-desoxyoctonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
NPN	N-Phenyl-1-naphthylamin
OD	Optische Dichte
PL	Phospholipid
T_t	Umwandlungstemperatur
ΔT	Breite der Phasenumwandlung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

G. LITERATURVERZEICHNIS

1 Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. and Nikaido, H. (1971) in Microbial Toxins (Ajl, S.J. and Kadis, S. eds.) Vol 4 (Weinbaum, G., Kadis, S. and Ajl, S.J. eds.) S. 145-224, Academic Press, New York and London

2 Osborn, M.J. and Rothfield, L.I. (1971) in Microbial Toxins (Ajl, S.J. and Kadis, S., eds.) Vol. 4 S. 331-349, Academic Press, New York and London

3 Robbins, P.W. and Wright, A. (1971) in Microbial Toxins (Ajl, S.J. and Kadis, S., eds.) Vol. 4 S. 351-366, Academic Press, New York and London

4 Burge, R.E. and Draper, J.C. J. Mol. Biol. 28, 205-210 (1967)

5 Mühlradt, P.F., Menzel, J., Golecki, J.R. and Speth, V. Eur. J. Biochem. 43, 533-539 (1974)

6 Mühlradt, P.F. and Golecki, J.R. Eur. J. Biochem. 51, 343-351 (1975)

7 Mühlradt, P.F. Biologie in unserer Zeit 5, 33-40 (1975)

8 Braun, V., Rotering, H., Ohms, J.P. and Hagenmaier, H. Eur. J. Biochem. 70, 601-610 (1976)

9 Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. and Jann, K. Bacteriol. Rev. 41, 667-710 (1977)

10 Wiesmann, E. Medizinische Mikrobiologie S. 88-90 (1974) G. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage

11 Mc Carty, M. in
Microbiology (Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. and Wood Jr., E.B. eds.) S. 762-766, Harper International Edition, 2. Auflage (1973)

12 Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V. and Rietschel, E.Th. (1974)
J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol. 18,381-390

13 Skidinore, B.J.
J. Immunol. 114, 770 (1975)

14 Schlesinger, D. ed. (1977)
Microbiology Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

15 Rothfield, L., Takeshita, M., Pearlman, M. and Horne, R.W.
Federation Proc. 25, 1495 (1966)

16 Shands Jr., J.W. (1971) in
Microbial Toxins (Ajl, S.J. and Kadis, S., eds.) Vol. 4 S. 127-144, Academic Press, New York and London

17 Luzzati, V. in
Biological Membranes (Chapman, D., ed.) S. 71-123, Academic Press, New York (1968)

18 Träuble, H. and Overath, P.
Biochim. Biophys. Acta 307, 491-512 (1973)

19 Träuble, H. and Eibl, H.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 214-219 (1974)

20 Jacobson, K. and Papahadjopoulos, D.
Biochem. 14, 152-161 (1975)

21 Emmerling, G.
Diplomarbeit, Tübingen (1975)

22 Luzzati, V. in
Perspectives in Membrane Biology (Estrada-O., S. and Gitler, C. eds.) S. 25-44 Academic Press, New York (1974)

23 Ranck, J.L., Mateu, L., Sadler, D.M. Tardieu, A., Gulik-Krzywicki, T. and Luzzati, V.
J. Mol. Biol. 85, 249-277 (1974)

24 Hindennach, I. and Henning, U.
Eur. J. Biochem. 59, 207-213 (1975)

25 Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.
Eur. J. Biochem. 9, 245-249 (1969)

26 Galanos, C. and Lüderitz, O.
Eur. J. Biochem. 54, 603-610 (1975)

27 Rothfield, L. in
Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. ed.)
Vol. 32, S. 450-459, Academic Press,
New York (1974)

28 Skurray, R.A., Hancock, R.E. and Reeves, P.
J. Bacteriology 119, 726-735 (1974)

29 Henning, U. and Haller, I.
FEBS Letters 55, 161-164 (1975)

30 Overath, P., Hill, F.F. and Lamnek-Hirsch,I.
Nat. New Biol. 264-267 (1971)

31 Overath, P., Brenner, M., Gulik-Krzywicki, T., Shechter, E. and Letellier, L.
Biochim. Biophys. Acta 389, 358-369 (1975)

32 Braun, V., Gnirke, H., Henning, U. and Rehn, K.
J. Bacteriol. 114, 1264-1270 (1973)

33 Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J.
J. Biol. Chem. 247, 3962-3972 (1972)

34 Devor, K.A., Teather, R.M. Brenner, M., Schwarz, H., Würz, H. and Overath, P.
Eur. J. Biochem. 63, 459-467 (1976)

35 Osborn, M.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 499-506 (1963)

36 Lüderitz, O.
persönliche Mitteilung

37 Smit, J., Kamio, Y. and Nikaido, H.
J. Bacteriol. 124, 942-958 (1975)

38 Koplow, J. and Goldfine, H.
J. Bacteriol. 117, 527-543 (1974)

39 Schweizer, M., Schwarz, H., Sonntag, I.
and Henning, U.
Biochim. Biophys. Acta 488, 474-491 (1976)

40 Romeo, D., Girard, A. and Rothfield, L.
J. Mol. Biol. 53, 475-490 (1970)

41 Jones, N.C. and Osborn, M.J.
J. Biol. Chem. 252, 7398-7404 (1977)

42 Jones, N.C. and Osborn, M.J.
J. Biol. Chem. 252, 7405-7412 (1977)

Lebenslauf

Am 8. September 1948 wurde ich, Georg Emmerling, als Sohn des Bäckermeisters Georg Emmerling und seiner Ehefrau Emma, geb. Bachschuster, in Gunzenhausen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Gunzenhausen von September 1954 bis September 1958 wechselte ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium über und legte dort am 21. Juli 1967 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen, das ich im April 1974 mit der Diplomprüfung abschloß. Von September 1974 bis April 1975 fertigte ich meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie unter Anleitung von Professor Dr. U. Henning an.

Im Sommersemester 1971 nahm ich zusätzlich das Medizin-Studium auf. Das Physikum bestand ich im März 1973. Anfang November 1975 wurde das Medizin-Studium in Erlangen fortgesetzt, wo ich am 1. August 1977 die ärztliche Prüfung ablegte.

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden von Mai bis Oktober 1975 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen durchgeführt.